

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



TESIS DOCTORAL

**Estudio comparativo de la seguridad de distintas vacunas
vivas atenuadas frente al Síndrome Reproductor y
Respiratorio Porcino**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Laura Carrascosa De Lome

DIRECTORES

Cinta Prieto Suárez
José María Castro Arganda
Francisco Javier Martínez Lobo

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



TESIS DOCTORAL

**Estudio comparativo de la seguridad de distintas vacunas vivas
atenuadas frente al Síndrome Reproductor y Respiratorio
Porcino**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Laura Carrascosa De Lome

Directores:

Cinta Prieto Suárez
José M^a Castro Arganda
Francisco Javier Martínez Lobo

Madrid, 2017

Dña. Cinta Prieto Suárez, profesora titular del Departamento de Sanidad Animal, D. José M^a Castro Arganda, Catedrático de Universidad del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) y D. Francisco Javier Martínez Lobo, profesor lector de la Universitat de Lleida,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada “Estudio comparativo de la seguridad de distintas vacunas vivas atenuadas frente al Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino” que presenta la Licenciada en Veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid Dña. Laura Carrascosa De Lome, para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en las dependencias del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo nuestra dirección y cumple todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

De acuerdo con la normativa vigente, firmamos el presente certificado, autorizando su presentación como directores de la mencionada tesis doctoral en Madrid, a ventiseis de Marzo de dos mil diecisiete.

Fdo.: Cinta Prieto Suárez

Fdo.: José M^a Castro Arganda

Fdo.: Francisco Javier Martínez Lobo

Dedicada a mi familia,

Agradecimientos

En primer lugar quisiera expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis, los doctores Francisco Javier Martínez Lobo, Cinta Prieto Suárez y Jose María Castro Arganda.

Al Dr. Francisco Javier Martínez, no sólo por sus conocimientos y orientación en la realización de este proyecto sino también por su paciencia, disponibilidad y apoyo incondicional.

A la Dra. Cinta Prieto por sus ganas de hacer nuevos proyectos, de enseñar y su inestimable ayuda en todos los momentos en los que la he necesitado.

Al Dr. José María Castro por haberme permitido desarrollar este trabajo y, sin el cual, no habría sido posible.

A la Dra. Isabel Simarro por todo el apoyo y cariño que me ha mostrado a lo largo de todo este período.

A mis amigos y compañeros de trabajo por estar ahí en todos los momentos difíciles y siempre tener palabras de ánimo.

A mis padres, hermana y, por supuesto, a David que como siempre me han apoyado y ayudado además de darme su cariño y comprensión en todo momento.

A todos ellos, gracias.

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS.....	1
LISTADO TABLAS.....	3
LISTADO DE FIGURAS	7
Summary	9
Resumen.....	11
1. Introducción	15
1.1. Etiología.....	15
1.2. Variabilidad del VSRRP	18
1.2.1. Variabilidad genómica.....	19
1.2.2. Variabilidad antigénica.....	20
1.2.3. Variabilidad patogénica.....	22
1.3. Epidemiología del VSRRP.....	24
1.4. Patogenia.....	27
1.4.1. Distribución orgánica del virus.....	27
1.4.2. Patogenia de la enfermedad respiratoria	29
1.4.3. Efecto del VSRRP en cerdas.....	29
1.4.4. Efecto del VSRRP en el verraco	31
1.5. Sintomatología y lesiones	32
1.5.1. Sintomatología asociada a la reproducción	32
1.5.2. Sintomatología en animales en crecimiento.....	33
1.5.3. Lesiones.....	34
1.6. Respuesta inmunitaria	36
1.6.1. Respuesta inmune humoral	38
1.6.2. Respuesta inmune celular	39
1.7. Diagnóstico.....	40
1.7.1. Detección del virus.....	40
1.7.2. Determinación de anticuerpos frente al virus	42
1.8. Prevención y control	44
2. Justificación y objetivos.....	55
3. Materiales y métodos	57
3.1. Cultivos celulares.....	57
3.1.1. Cultivos primarios de MAP	57

3.1.2.	Cultivo y mantenimiento de la línea celular estable MARC-145.....	57
3.2.	Vacunas utilizadas en el estudio	58
3.3.	Diseño experimental	59
3.3.1.	Animales e instalaciones	59
3.3.2.	Inoculación experimental.....	59
3.3.3.	Toma de muestras.....	60
3.4.	Evaluación de síntomas y lesiones pulmonares	61
3.5.	Determinación de la presencia del VSRRP en las muestras obtenidas	63
3.5.1.	Procesamiento de las muestras	63
3.5.2.	Detección del VSRRP mediante aislamiento vírico en las muestras obtenidas ..	63
3.5.3.	Titulación de las muestras positivas por aislamiento vírico.....	64
3.5.4.	Detección del VSRRP mediante la técnica de RT-PCR	65
3.5.5.	Detección del VSRRP mediante inmunohistoquímica.....	66
3.6.	Detección de anticuerpos totales frente al VSRRP	67
3.7.	Análisis estadísticos.....	68
4.	Resultados	69
4.1.	Signos clínicos.....	69
4.2.	Lesiones	71
4.3.	Detección del VSRRP en los cerdos vacunados	73
4.3.1.	Viremia	73
4.3.2.	Distribución orgánica	78
4.3.3.	Determinación de la presencia del VSRRP mediante inmunohistoquímica en las muestras de pulmón	87
4.3.4.	Eliminación del VSRRP por distintas rutas.....	87
4.4.	Seroconversión.....	92
4.5.	Transmisión del VSRRP a los cerdos centinela	93
4.5.1.	Síntomas asociados a la infección de los cerdos centinela	93
4.5.2.	Determinación de la viremia en cerdos centinela.....	93
4.5.3.	Determinación de la excreción del VSRRP por los cerdos centinela	97
4.5.4.	Seroconversión de los cerdos centinela.....	101
5.	Discusión	103
6.	Conclusiones.....	123
7.	Bibliografía	125

LISTADO DE ABREVIATURAS

aa: Aminoácido

ADE: Potenciamiento dependiente de anticuerpos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AN: Anticuerpos neutralizantes

ANOVA: Análisis de la varianza

ARN: Ácido ribonucleico

BAL: Lavado broncoalveolar

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad

CPA: Células presentadoras de antígeno

°C: Grados centígrados

DI50CT: Dosis infectivas 50 en cultivo tisular

DMEM: Medio esencial mínimo modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido

ECP: Efecto citopático

ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

g: Gramo

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de la línea granulocito-macrófago

HE: Hematoxilina-eosina

i.e.: id est

Ig: Inmunoglobulina

IHQ: Inmunohistoquímica

IFD: Inmunofluorescencia directa

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

IFN: Interferón

IL: Interleuquina

IPMA: Ensayo de inmunoperoxidasa en monocapa

IRF: Factor regulador de interferón

I.S.D: Inguinal superficial derecho

I.S.I: Inguinal superficial izquierdo

KDa: Kilodalton

L.N.: Linfonodo

log: Logaritmo en base 10

MAP: Macrófagos alveolares porcinos

ml: Mililitro

μl: Microlitro

NE: Epítipo neutralizante

NF-βK: Factor nuclear kappa beta

nsp: Proteína no estructural

nt: Nucleótido

ORF: Fase de lectura abierta

pb: Pares de bases
PBS: Tampón fosfato salino
PBMC: Células mononucleares de sangre periférica
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PG: Prostaglandina
p.i: Post -infección
p.v: Post- vacunación
RFLP: Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción
RT: Transcripción inversa
S.D: Superficial derecho
S.I: Superficial izquierdo
SFB: Suero fetal bovino
SN: Seroneutralización
SRRP: Síndrome reproductor y respiratorio porcino
s/s/a: sustituciones por sitio y año
TLR: Receptor tipo Toll
TNF: Factor de necrosis tumoral
Tregs: Células T reguladoras
VA: Virus Ankara
VAE: Virus de la arteritis vírica equina
VGET: Virus de la gastroenteritis transmisible
VSRRP: Virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino
VVM: Vacuna viva modificada
WT: Salvaje

LISTADO TABLAS

- Tabla 1: Baremo de puntuación utilizado para la evaluación de la sintomatología observada en los animales expuestos al VSRRP de forma experimental.....	61
- Tabla 2: Baremo de puntuación desarrollado por Halbur <i>et al.</i> (1995) y utilizado para evaluar la gravedad de las lesiones microscópicas producidas por el VSRRP en el pulmón de los animales inoculados experimentalmente	62
- Tabla 3: Temperaturas rectales medias registradas para cada grupo experimental desde tres días antes de la vacunación hasta el final del experimento en el día +21	69
- Tabla 4: Peso medio de los animales vacunados en cada uno de los grupos experimentales en los distintos días en los que se registró este parámetro.....	70
- Tabla 5: Porcentaje medio de superficie pulmonar afectada en los días 7, 14 y 21 p.v. en cada uno de los grupos experimentales	72
- Tabla 6: Valores medios de lesiones microscópicas observadas en los días 7, 14 y 21 p.v. en cada uno de los grupos experimentales	73
- Tabla 7: Resultados de aislamiento vírico en la línea celular MARC-145 y en cultivos primarios de MAPs a partir de las muestras de suero obtenidas de los cerdos vacunados de los distintos grupos experimentales a lo largo del estudio	74
- Tabla 8: Resultados de titulación vírica en cultivos de la línea celular MARC-145 de las muestras de suero procedentes de animales pertenecientes al Grupo A.....	75
- Tabla 9: Resultados de titulación vírica en cultivos de la línea celular MARC-145 de las muestras de suero procedentes de animales pertenecientes al Grupo B	76
- Tabla 10: Resultados de titulación vírica en cultivos de la línea celular MARC-145 de las muestras de suero procedentes de animales pertenecientes al Grupo C	76

- Tabla 11: Resultados de titulación vírica en cultivos de la línea celular MARC-145 de las muestras de suero procedentes de animales pertenecientes al Grupo D.....	77
- Tabla 12: Resultados de aislamiento vírico en la línea celular MARC-145 a partir de las muestras de los distintos tejidos recogidos en la necropsia de los cerdos vacunados de cada grupo experimental.....	79
- Tabla 13: Frecuencia total de aislamiento del VSRRP en la línea celular MARC-145 a partir de las muestras de los distintos órganos recogidos en la necropsia de los cerdos vacunados de cada grupo experimental	80
- Tabla 14: Resultados de la titulación vírica en la línea celular MARC-145 de las muestras de órganos procedentes de los animales del Grupo A.....	82
- Tabla 15: Resultados de la titulación vírica en la línea celular MARC-145 de las muestras de órganos procedentes de los animales del Grupo B	83
- Tabla 16: Resultados de la titulación vírica en la línea celular MARC-145 de las muestras de órganos procedentes de los animales del Grupo C	84
- Tabla 17: Resultados de la titulación vírica en la línea celular MARC-145 de las muestras de órganos procedentes de los animales del Grupo D.....	85
- Tabla 18: Número y porcentaje de animales cuyas muestras de pulmón dieron un resultado positivo para la detección del VSRRP mediante la técnica de inmunohistoquímica en los distintos días del experimento.....	87
- Tabla 19: Frecuencia de aislamiento vírico en la línea celular MARC-145 a partir de los hisopos nasales, orales y rectales tomados a lo largo del experimento de los cerdos vacunados de todos los grupos experimentales	89
- Tabla 20: Resultados de aislamiento vírico en la línea celular MARC-145 a partir de las muestras de suero obtenidas de los animales centinelas de los distintos grupos experimentales a lo largo del experimento	94

- Tabla 21: Resultados de la titulación vírica en la línea celular MARC-145 de las muestras de suero positivas por aislamiento vírico procedentes de los animales centinela del Grupo A.....	95
- Tabla 22: Resultados de la titulación vírica en la línea celular MARC-145 de las muestras de suero positivas por aislamiento vírico procedentes de los animales centinela del Grupo B.....	96
- Tabla 23: Resultados de la titulación vírica en la línea celular MARC-145 de las muestras de suero positivas por aislamiento vírico procedentes de los animales centinela del Grupo C.....	96
- Tabla 24: Resultados de la titulación vírica en la línea celular MARC-145 de las muestras de suero positivas por aislamiento vírico procedentes de los animales centinela del Grupo D.....	97
- Tabla 25: Frecuencia de aislamiento vírico en la línea celular estable MARC-145 a partir de los hisopos nasales, orales y rectales tomados de los animales centinela de los distintos grupos experimentales a lo largo del estudio.....	98
- Tabla 26: Número de animales centinela de cada uno de los grupos experimentales seropositivos para el VSRRP en cada uno de los días del estudio.....	101

LISTADO DE FIGURAS

- **Figura 1:** Ganancia media diaria de los cerdos vacunados de cada uno de los grupos experimentales en los distintos períodos del experimento 71
- **Figura 2:** Título vírico medio obtenido en cultivos de la línea celular estable MARC-145 a partir de las muestras de suero positivas por aislamiento vírico procedentes de los animales vacunados en los distintos grupos experimentales cada uno de los días p.v. analizados 77
- **Figura 3:** Frecuencia aislamiento del VSRRP en la línea celular MARC-145 a partir de las muestras de los distintos órganos recogidos en la necropsia de los cerdos vacunados de cada grupo experimental..... 81
- **Figura 4:** Título vírico medio obtenido en la línea celular MARC-145 para los distintos órganos recogidos en la necropsia de los cerdos vacunados de cada grupo experimental 86
- **Figura 5:** Frecuencia de aislamiento del VSRRP a partir de los hisopos nasales obtenidos de los animales vacunados de los distintos grupos experimentales en distintos momentos post-vacunación 90
- **Figura 6:** Frecuencia de aislamiento del VSRRP a partir de los hisopos orales obtenidos de los animales vacunados de los distintos grupos experimentales en distintos momentos post-vacunación 90
- **Figura 7:** Frecuencia de aislamiento del VSRRP a partir de los hisopos rectales obtenidos de los animales vacunados de los distintos grupos experimentales en distintos momentos post-vacunación 91
- **Figura 8:** Frecuencia global de aislamiento del VSRRP a partir de los distintos hisopos obtenidos de los animales vacunados de los distintos grupos experimentales 91
- **Figura 9:** Porcentaje de animales seropositivos al VSRRP en cada uno de los grupos experimentales a lo largo del estudio..... 92
- **Figura 10:** Porcentaje de cerdos centinela virémicos en cada uno de los grupos experimentales a lo largo del estudio 95

- **Figura 11:** Frecuencia de aislamiento del VSRRP a partir de los
distintos hisopos tomados a los animales centinela del Grupo A
a lo largo del estudio 99

- **Figura 12:** Frecuencia de aislamiento del VSRRP a partir de los
distintos hisopos tomados a los animales centinela del Grupo B
a lo largo del estudio 99

- **Figura 13:** Frecuencia de aislamiento del VSRRP a partir de los
distintos hisopos tomados a los animales centinela del Grupo C
a lo largo del estudio 100

- **Figura 14:** Frecuencia de aislamiento del VSRRP a partir de los
distintos hisopos tomados a los animales centinela del Grupo D
a lo largo del estudio 100

- **Figura 15:** Frecuencia de seropositividad en los animales centinela
de cada uno de los grupos experimentales a lo largo del estudio 101

SUMMARY

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) is one of the most significant diseases affecting swine production worldwide. The main clinical outcomes of the disease are reproductive failure in gestating sows and respiratory distress in growing pigs, especially in piglets. c

The causal agent, PRRS virus (PRRSV), is a small, enveloped, single-stranded positive-sense RNA virus of the *Arteriviridae* family.

Although, in general, PRRS is clinically similar in North America and Europe, the respective strains differ in virulence and in antigenic and genetic properties. These differences have led to the classification of PRRSV isolates into two genotypes.

The huge impact of PRRS in the swine industry has stimulated the development of various types of vaccines, including inactivated vaccines and modified-live virus (MLV) vaccines, for the control of the disease in both growing pigs and breeding females.

MLV vaccines based on type 1 and type 2 viruses were originally developed for the control of PRRS in growing pigs, although some of them are now registered for the control of the reproductive form of PRRS.

However, despite the extensive marketing of the various products developed by different laboratories, they have generated much controversy, mainly related to the safety of them. These suspicions derive both from the results carried out under experimental conditions as the evidences from the application of such vaccines in field working conditions. Thus, experimental studies carried out with Ingelvac® PRRS MLV, a vaccine based on a type 2 isolate, have demonstrated that vaccine virus replicates in vaccinated pigs, causes detectable viremia, persists in the organism of vaccinates for weeks and is shed by different routes causing the infection of sentinel pigs. In addition, the virus can cross the placental barrier in pregnant sows infecting the developing fetuses and can be transmitted to naive newborn piglets during lactation.

Even more, reversions to virulence have been suspected in the field based on the similarity between the vaccine strain and some strains that have caused clinical problems in areas where the vaccine has been used, so it must be remembered that there is a potential risk of recombinant vaccine strains with strains circulating in the population and can lead to reversion to virulence or, even more, to the appearance of new strains that are more virulent than those existing prior to vaccination.

Despite the knowledge in relation to the safety of type 2 Ingelvac® PRRS MLV vaccine, not much information has been published about the safety of MLV vaccines based on type 1 PRRS viruses, even though they are frequently used for the control of the disease in several European countries. In fact, there are only a few reports that demonstrate that these vaccines replicate in the host causing viremia during variable periods of time both in growing pigs and in

breeding females, which can lead to transplacental infection of fetuses. However, no information is available regarding the ability of these vaccine strains of being shed and transmitted to in-contact pigs.

Even more, the above mentioned studies have been carried out under different experimental conditions and have been conducted by different research groups. This makes the results of the various experiments are hardly comparable and age and physiological and/or productive stage of animals used are different, as well as the experimental design followed in relation to the collect and analysis of samples and to the clinical and virological parameters evaluated.

As a result, nowadays, it is impossible to determine whether different vaccines strains commercially available differ in their safety properties, despite the various works carried out aimed to know their safety properties.

Consequently, the objective of the present study was to compare the safety of all MLV vaccines commercially available in Europe under the same experimental conditions to elucidate, based on this parameter, if the application of some of them is more appropriate or, conversely, can be considered safe all similarly.

For this purpose, one hundred and twenty three-week-old piglets, divides into five groups, were used.

On day 0 of the experiment, nine pigs per group were removed and the remaining fifteen were vaccinated with the commercial vaccines Ingelvac® PRRS MLV, Amervac ®PRRS, Pyrsvac-183® and Porcilis® PRRS by the intramuscular route following the manufacturers' instructions or were mock vaccinated and used as controls. On day 3, the nine unvaccinated pigs were re-introduced into their respective groups and served as sentinel pigs.

Clinical signs were recorded daily, blood samples and swabs were taken every three days and on days 7, 14 and 21, five vaccinated pigs per group were euthanized to determine lung lesions and different organs were collected at necropsy to determine the presence of PRRSV.

None of the vaccines studied caused detectable clinical signs in vaccinated pigs although lung lesions were found. Altogether, these results indicate that all vaccines can be considered clinically safe.

However, some differences were found in virological parameters. Thus, neither Pyrsvac-183® nor Porcilis® PRRS could be detected in porcine alveolar macrophage (PAM) cultures or in lung sections used to determine PRRSV by immunohistochemistry, indicating that these viruses might have lost their ability to replicate in PAM. This inability to replicate in PAM might be related to the lower transmission rate and the delay in the onset of viremia observed in these groups.

RESUMEN

El Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino (SRRP) es una de las enfermedades con mayor significación en la producción porcina a escala mundial. Sus principales manifestaciones son un fallo reproductivo en las hembras gestantes y alteraciones respiratorias en animales en crecimiento, fundamentalmente en lechones.

El agente causal del SRRP es un virus de pequeño tamaño, con envoltura y ARN de cadena sencilla y de polaridad positiva perteneciente a la familia *Arteriviridae*.

Aunque desde el punto de vista clínico las cepas del VSRRP en América del Norte y Europa son muy similares, sus diferencias en la virulencia y en sus propiedades antigénicas y genéticas han llevado a clasificar los distintos aislados del virus en dos genotipos.

El gran impacto de esta enfermedad en la industria porcina ha impulsado el desarrollo de varios tipos de vacunas, incluyendo vacunas inactivadas y vivas modificadas (MLV) para el control de la enfermedad tanto en cerdos en crecimiento como en cerdas reproductoras.

Las vacunas vivas modificadas basadas en el genotipo 1 y 2 fueron desarrolladas inicialmente para el control del VSRRP en cerdos en crecimiento, sin embargo, algunas de ellas han sido registradas, más tarde, para el control de la forma reproductiva de este síndrome.

No obstante, a pesar de la amplia comercialización de los diversos productos desarrollados por diferentes laboratorios, han generado una gran polémica debido, fundamentalmente, a cuestiones relacionadas con la seguridad de las mismas. Estas sospechas derivan tanto de los resultados llevados a cabo en condiciones experimentales como de indicios procedentes de la aplicación de dichas vacunas en condiciones de campo. Así, estudios experimentales llevados a cabo con la vacuna, basada en un aislado de genotipo 2, Ingelvac® PRRS MLV han demostrado la replicación del virus vacunal en los cerdos vacunados causando una viremia detectable, persistiendo en el organismo de los animales vacunados durante semanas y eliminándose por distintas rutas pudiendo transmitirse a animales susceptibles no vacunados. Además, el virus vacunal es capaz tanto de atravesar la barrera placentaria e infectar a los fetos en desarrollo como de infectar a los recién nacidos durante la lactación.

Por otra parte, en el caso de esta cepa vacunal existen sospechas de reversión a virulencia basándose en similitudes encontradas entre la cepa vacunal y algunas cepas que han producido patología clínica en áreas donde se ha empleado la vacuna, por lo que hay que tener presente que existe un riesgo potencial de recombinación de las cepas vacunales con cepas que circulen en la población, pudiendo dar lugar a la reversión a virulencia o incluso a nuevas cepas que sean más virulentas que las existentes antes de la vacunación.

Sin embargo, a pesar del conocimiento existente en relación a la seguridad de la vacuna anteriormente mencionada, no existe mucha información publicada acerca de la seguridad de otras vacunas vivas modificadas basadas en aislados del genotipo 1 que son utilizadas, frecuentemente, en el control de la enfermedad en diversos países de Europa. De hecho, sólo hay unos pocos estudios que demuestran que estas vacunas replican en el hospedador

causando viremia durante períodos variables de tiempo en animales en crecimiento y en cerdas reproductoras pudiendo conducir a la infección transplacentaria de los fetos. Sin embargo, con respecto a la capacidad de estas cepas vacunales de ser eliminadas y transmitidas a cerdos en contacto no hay información disponible.

Además, todos los estudios mencionados anteriormente están realizados en condiciones experimentales distintas y han sido realizados por grupos de investigación diferentes. Esto hace que los resultados obtenidos en los distintos experimentos sean difícilmente comparables y que la edad y el estado fisiológico y/o productivo de los animales utilizados son diferentes, así como el diseño experimental seguido en relación con la toma y análisis de muestras y con los parámetros clínicos y virológicos evaluados.

Como resultado, en la actualidad resulta imposible determinar si existen diferencias en la seguridad de las distintas vacunas vivas atenuadas existentes en el mercado, a pesar de los diversos trabajos realizados encaminados a conocer la seguridad de las mismas.

Por tanto, el objetivo general de este estudio es comparar la seguridad de las cuatro vacunas vivas atenuadas que se comercializan en Europa bajo las mismas condiciones experimentales con el fin de concluir si, en función de este parámetro, la aplicación de alguna de ellas resulta más adecuado o, por el contrario, toda ellas pueden considerarse seguras de forma similar.

Para la consecución de este objetivo, se necesitaron ciento veinte lechones de tres semanas de edad que fueron divididos en cinco grupos.

En el día 0 del experimento, se aislaron de cada grupo nueve cerdos, siendo vacunados los quince cerdos restantes de cada grupo (A, B, C, D) con las vacunas comerciales Ingelvac® PRRS MLV, Amervac® PRRS, Pyrsvac-183® y Porcilis® PRRS, respectivamente, vía intramuscular siguiendo las instrucciones de los respectivos fabricantes y utilizando el quinto grupo, E, como grupo control. El día 3, los nueve cerdos no vacunados fueron reintroducidos en sus respectivos grupos y utilizados como cerdos centinela.

Diariamente se llevo a cabo una valoración clínica de cada uno de los animales, cada 3 días se tomaron muestras de sangre e hisopos de distintas secreciones de todos los animales utilizados en el estudio y en los días 7, 14 y 21 del experimento se sacrificaron cinco lechones vacunados de cada uno de los grupos experimentales para valorar las lesiones pulmonares y realizar la necropsia completa de cada animal, tomando muestras de los distintos órganos, con el fin de determinar la presencia del VSRRP con posterioridad.

De esta manera, se observó que, a pesar de encontrarse lesiones pulmonares, ninguna de las vacunas estudiadas causó signos clínicos detectables en los cerdos vacunados lo cual indica que todas las vacunas empleadas en este estudio pueden considerarse clínicamente seguras.

Sin embargo, en lo que a parámetros virológicos se refiere sí que se pudieron encontrar algunas diferencias entre las distintas vacunas. Así, ni la vacuna Pyrsvac-183® ni la vacuna Porcilis® PRRS pudieron detectarse en cultivos de MAPs o en las secciones de pulmón empleadas para determinar el VSRRP mediante la técnica de inmunohistoquímica, indicando esto que estos virus podrían haber perdido su capacidad para replicar en MAPs, pudiendo

estar relacionada esa incapacidad con la baja tasa de transmisión y el retraso en el comienzo de la viremia observada en estos grupos.

1. INTRODUCCIÓN

El síndrome reproductor y respiratorio porcino (SRRP) se describe por primera vez en Los Estados Unidos de América (EE.UU.), a finales de los años 80 del siglo pasado (Keffaber, 1989; Wensvoort *et al.*, 1991), con el nombre de “Enfermedad misteriosa del cerdo” dado que se trataba de una patología aparentemente nueva, con una etiología desconocida, que producía alteraciones en la reproducción y enfermedad respiratoria (Dial *et al.*, 1990). Por otro lado, en Alemania a finales de 1990 se detectó un proceso caracterizado por la aparición de un fallo en la reproducción (Lindhaus y Lindhaus, 1991) que pronto afectó a varios países del entorno, incluyendo, entre otros, los Países Bajos, El Reino Unido (Wensvoort *et al.*, 1991) y Francia.

En España, los primeros casos se observaron en Cataluña, en un lote de lechones importados de Alemania, que mostraron signos clínicos de naturaleza respiratoria (Plana Durán *et al.*, 1992). Poco después se observó un síndrome similar al descrito en Alemania, y cuya etiología no fue determinada, en explotaciones de ciclo cerrado cercanas a la zona donde habían aparecido los problemas respiratorios. Desde este brote inicial, y a pesar de ordenarse el sacrificio obligatorio de todos los animales de las granjas afectadas, el proceso acabó extendiéndose por todo el país.

El nombre de Síndrome Reproductor y Respiratorio Porcino fue asignado en 1991 por la Comisión Europea, que estableció numerosas medidas de control, que no tuvieron éxito, con el propósito de evitar su diseminación por toda Europa.

La distribución del SRRP no se limitó a Norte América y Europa, sino que se detectó en numerosos países de Latinoamérica y Asia (Shin *et al.*, 1993; Kang *et al.*, 1994; Kuwahara *et al.*, 1994; Shimizu *et al.*, 1994; Hirose *et al.*, 1995; Chueh *et al.*, 1998), alcanzando pronto una difusión mundial.

En la actualidad, el SRRP se considera una de las enfermedades más importantes de la producción porcina a nivel mundial.

1.1. ETIOLOGÍA

El VSRRP es un virus con envoltura, con forma esférica y un tamaño de 45 a 80 nm de diámetro cuyo genoma es una molécula de ARN de cadena sencilla, poliadenilada y de polaridad positiva (Ohlinger *et al.*, 1991; Wensvoort *et al.*, 1991; Benfield *et al.*, 1992a, b; Kim *et al.*, 1993). En cuanto a su clasificación taxonómica, el VSRRP pertenece, junto con el virus de la arteritis equina (VAE), el virus elevador de la lactato-deshidrogenasa del ratón, y el virus de la fiebre hemorrágica de los simios, al género *Arterivirus*, único género de la familia *Arteriviridae*, que a su vez pertenece al orden Nidovirales (Cavanagh, 1997; Benfield *et al.*, 1992a). Los miembros de la familia *Arteriviridae* son similares en lo que se refiere a la morfología del virión, la organización del genoma, la estrategia de replicación y transcripción y la composición proteica. Además, todos ellos comparten una serie de características que los diferencia de otros virus,

como son la capacidad de replicación en macrófagos, la capacidad de causar infecciones persistentes y asintomáticas y la elevada variabilidad genómica que presentan (Snijder y Meulenberg, 1998).

En este sentido, la variabilidad genómica del VSRRP es una de sus principales señas de identidad, hasta el punto de que los aislados del virus se pueden clasificar en dos genotipos claramente diferenciados, el genotipo 1 y el genotipo 2, representados por las cepas prototipo Lelystad y VR-2332, respectivamente (Meng *et al.*, 1995b, 2000; Murtaugh *et al.*, 1995; Suarez *et al.*, 1996b; Allende *et al.*, 1999). A pesar de que cuando la enfermedad se describió la circulación de aislados de cada uno de los genotipos estaba circunscrita a áreas geográficas concretas, circulando el genotipo 1 en países europeos y el genotipo 2 en países americanos, en la actualidad ambos genotipos tienen una distribución mundial (Fang *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2004; Nam *et al.*, 2009; Ropp *et al.*, 2004; Stadejek *et al.*, 2002), aunque se mantiene la supremacía de aislados de genotipo 1 en Europa y de genotipo 2 en América.

El genoma del VSRRP tiene un tamaño que oscila entre 15,1 y 15,5 kb y posee 10 marcos de lectura abierta u ORFs (del inglés, *Open Reading Frames*) que se solapan entre sí y se transcriben en la célula infectada como una serie de ARNm subgenómicos mediante un fenómeno de transcripción discontinua (Snijder y Meulenberg, 1998).

Las ORFs 1a y 1b comprenden cerca del 80% del genoma y codifican sendas poliproteínas que se procesan, posteriormente, mediante un proceso autocatalítico en un total de 14 proteínas funcionales. Todas ellas son proteínas no estructurales, implicadas en los procesos de replicación, entre las cuales destacan la ARN-polimerasa dependiente de ARN (Den Boon *et al.*, 1995; Snijder y Meulenberg, 1998; Van Aken *et al.*, 2006; Ziebuhr *et al.*, 2000).

El resto de las ORFs codifican las distintas proteínas estructurales esenciales para que el virus lleve a cabo su acción.

La ORF2 codifica dos proteínas estructurales: la proteína GP2, que es una glicoproteína minoritaria de la envoltura del VSRRP que induce bajos niveles de anticuerpos neutralizantes (AN) en conejo y cerdo (Dea *et al.*, 2000) y la proteína 2b, no glicosilada, que se encuentra bastante conservada entre aislados europeos y americanos del virus.

La ORF3 codifica la proteína más glicosilada del VSRRP, GP3, ya que presenta siete posibles sitios de N-glicosilación muy conservados entre aislados (Mardassi *et al.*, 1995; Meulenberg *et al.*, 1995; Murtaugh *et al.*, 1995; Gonin *et al.*, 1998). Se trata de una proteína muy heterogénea entre aislados europeos y americanos (Mardassi *et al.*, 1995; Meulenberg y Besten., 1996) y, además, parece tratarse de una proteína muy antigénica (Plana Durán *et al.*, 1997a; Gonin *et al.*, 1998) y es posible que, en la misma, existan epítomos neutralizantes (Cancel-Tirado *et al.*, 2004).

La ORF4 codifica la GP4 que posee cuatro posibles sitios de N-glicosilación altamente conservados entre aislados europeos y americanos (Meulenberg *et al.*, 1995, 1996, 1997; Murtaugh *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1998). El dominio neutralizante de la proteína GP4 del virus Lelystad se ha localizado en una región hidrófila expuesta entre los aminoácidos (aa) 40 y 79 (Meulenberg *et al.* 1997), junto a la región aminoterminal de la proteína que parece ser la

más variable entre las cepas europeas (Murtaugh *et al.* 1995; Meulenberg *et al.*, 1997). No obstante, la eficacia neutralizante de dichos anticuerpos ha sido menor a la mostrada por anticuerpos frente a la GP5 (Weiland *et al.*, 1999) y la inducción de AN por parte de esta proteína parece no estar conservada entre los genotipos del VSRRP (Meulenberg *et al.*, 1997), no habiéndose demostrado en cepas americanas del virus (Zhang *et al.*, 1998; Gonin *et al.*, 1999).

Estas 4 proteínas codificadas por las ORFs 2, 3 y 4, respectivamente (Meulenberg *et al.*, 1995, 1997; Meulenberg y Besten, 1996; Wu *et al.*, 2001, 2005), parecen estar asociadas mediante interacciones no covalentes (Van Breedam *et al.*, 2010) para desempeñar un papel importante en la entrada del virus en la célula y por tanto, necesarias para la replicación del virus (Welch *et al.*, 2004; Wissink *et al.*, 2005).

La proteína GP5, codificada por la ORF5, es la proteína mayoritaria de la envoltura y, a su vez, la más variable del virus existiendo una identidad entre aislados europeos y americanos del virus de tan solo entre el 51% y el 55% (Mardassi *et al.*, 1995; Andreyev *et al.*, 1997; Indik *et al.*, 2000). Se ha demostrado que anticuerpos monoclonales específicos frente a ella son capaces de neutralizar al virus (Pirzadeh y Dea, 1997; Zhang *et al.*, 1998; Weiland *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000). Es más, se ha demostrado la existencia de un epítipo neutralizante en el ectodominio de la GP5 tanto en aislados americanos (Ostrowski *et al.*, 2002; Plagemann, 2004b) como en aislados europeos del virus (Plagemann, 2004a; Wissink *et al.*, 2003), aunque su relevancia, e incluso su existencia, se ha cuestionado recientemente en el caso de los aislados europeos (Van Breedam *et al.*, 2011). Sin embargo, en el caso de aislados americanos, hay indicios de que la GP5 es la responsable de la inducción de AN (Gonin *et al.*, 1999; Weiland *et al.*, 1999; Dea *et al.*, 2000; Ostrowski *et al.*, 2002), los cuales aparecen, generalmente, a partir de la tercera semana post-infección (p.i.) (Loemba *et al.*, 1996; Gonin *et al.*, 1999; Murtaugh *et al.*, 2002; Ostrowski *et al.*, 2002). Por otra parte, y en relación con sus propiedades biológicas, se ha descrito que esta proteína posee carácter apoptótico (Suárez *et al.*, 1996a; Gagnon *et al.*, 2003), siendo probablemente responsable de la apoptosis inducida por el virus tanto *in vitro* (Suárez *et al.*, 1996a; Costers *et al.*, 2008) como *in vivo* (Sur *et al.*, 1997; Labarque *et al.*, 2003b; Karnyichuk *et al.*, 2011) aunque algunos autores lo ponen en tela de juicio (Lee *et al.*, 2004a, b).

La ORF6, a su vez, codifica una proteína de membrana (proteína M), altamente conservada que se sabe que está implicada en la respuesta de linfoproliferación (Bautista *et al.*, 1999), mientras que existen dudas acerca de su capacidad para inducir AN ya que, aunque algunos autores indican la existencia de AN que reaccionan específicamente con esta proteína (Yang *et al.*, 2000), otros lo niegan (Kwang *et al.*, 1999).

Ambas proteínas, GP5 y M, se unen formando heterodímeros que podrían estar relacionados con los procesos de ensamblaje vírico (Verheije *et al.*, 2002) y con la unión del virus a la célula hospedadora (Delputte *et al.*, 2002; Delputte y Nauwynck, 2004a) interaccionando, a través de moléculas de ácido siálico, con la sialoadhesina de los MAPs (Van Breedman *et al.*, 2010) y jugando, de esta manera, un papel relevante en la infectividad del virus.

Además, estudios recientes sugieren la existencia de interacciones entre estos heterodímeros GP5/ M y las proteínas GP2, 2b, GP3, GP4 (Van Breedam *et al.*, 2010).

La ORF5a codifica una proteína de membrana que presenta un dominio transmembrana, que está altamente conservada y cuya función se desconoce aunque podría estar asociada al procesamiento, transporte y empaquetamiento del ARN (Johnson *et al.*, 2011). Esta proteína se ha descrito que induce el desarrollo de anticuerpos en los cerdos infectados por el VSRRP (Johnson *et al.*, 2011) y la cinética de producción de los mismos muestra una apariencia similar a la observada previamente por los anticuerpos frente a la proteína GP5 y coincide con la producción de anticuerpos neutralizantes (Molina *et al.*, 2008; Mulupuri *et al.*, 2008). La baja expresión de anticuerpos es compatible con el bajo nivel de síntesis de proteínas por la ORF5a y apoya los datos *in vitro* que indican que esta proteína está presente en niveles bajos en las células infectadas y en viriones (Johnson *et al.*, 2011). Una posible explicación sería que provoque una respuesta inmune predominantemente mediada por células en lugar de una respuesta inmune predominantemente humoral (Jeong *et al.*, 2010).

Por último, la ORF7 codifica una proteína no glicosilada denominada proteína N, que interactúa con el ARN del virus y forma homodímeros (Lee *et al.*, 2006) constituyendo la cápside del virus (Mardassi *et al.*, 1995; Meulenberg *et al.*, 1995). Esta proteína se expresa abundantemente en las células infectadas, constituyendo entre el 20% y 40% del contenido proteico del virión (Meng *et al.*, 1995a). Por otra parte, la mayoría de anticuerpos producidos durante la infección son específicos para esta proteína (Loemba *et al.*, 1996), hecho que la convierte en una proteína adecuada para el diagnóstico de la enfermedad. Además se ha relacionado la presencia de esta proteína en el núcleo y nucléolo de la célula hospedadora con la capacidad replicativa del virus y con la falta de inducción de AN (Pei *et al.*, 2008).

1.2.VARIABILIDAD DEL VSRRP

Una de las características más destacadas del VSRRP es su gran variabilidad, la cual se ha puesto de manifiesto a lo largo del tiempo no sólo desde el punto de vista genómico, sino que también se han descrito diferencias biológicas y antigénicas significativas entre distintos aislados del virus.

En este sentido, desde la aparición de la enfermedad y el subsiguiente aislamiento del agente causal, se observaron diferencias en la capacidad de crecimiento del virus en distintos sistemas celulares. Así, se observó que los aislados europeos crecen en cultivos primarios de MAPs (Wensvoort *et al.*, 1991, 1993) mientras que las cepas americanas mostraban preferencia por las líneas celulares estables (Benfield *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1992a; Kim *et al.*, 1993; Meng *et al.*, 1994, 1996a). Sin embargo, en un estudio reciente se ha descrito que se aíslan un mayor número de virus americanos en MAPs que en la línea celular estable (De Abin *et al.*, 2009).

Estas diferencias de crecimiento en las distintas líneas celulares, aunque no están bien caracterizados, se atribuyen a cambios genómicos en la ORF5 del virus (Wesley *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2002).

1.2.1. VARIABILIDAD GENÓMICA

Este aspecto es el mejor estudiado, existiendo una gran cantidad de información relativa a las secuencias de distintos aislados del virus procedentes de distintos orígenes geográficos.

El análisis de estas secuencias ha permitido clasificar a los aislados del virus en dos genotipos diferentes: el genotipo 1, que incluye aislados europeos del virus, y el genotipo 2, que incluye aislados americanos (Meng *et al.*, 1995b; Snijder y Meulenberg, 1998), observándose una homología en general muy baja entre aislados de distinto genotipo, aunque variable en función de la proteína observada. Así, la homología oscila entre el 65 y el 67% para la ORF2 (Murtaugh *et al.*, 1995; Morozov *et al.*, 1995), el 64% para la ORF3 (Morozov *et al.*, 1995), el 63 y el 66% para la ORF4, el 61 y el 63% para ORF5 (Meng *et al.*, 1995a, b), y se sitúa en torno al 55% para ORF1a (Allende *et al.*, 1999) y el 63% para ORF1b (Nelsen *et al.*, 1999), siendo las ORFs 6 y 7 las más conservadas, con una homología que oscila entre el 78 y el 81% y el 63%, respectivamente (Dea *et al.*, 2000).

Al principio, la distribución geográfica de ambos genotipos estaba bien delimitada, aislándose el genotipo 2 en América y Asia y el 1 en Europa. Sin embargo, se ha descrito la presencia de cepas pertenecientes al genotipo europeo en EE.UU. (Ropp *et al.*, 2004; Fang *et al.* 2007), Corea del Sur y, en la actualidad, se ha documentado la circulación en China (Chen *et al.*, 2011).

Además, dentro de un mismo genotipo también se observan diferencias significativas en la secuencia de nucleótidos, aunque, generalmente, de menor magnitud que entre aislados de distinto genotipo. Así, en el caso de los aislados americanos del virus, entre las zonas más conservadas del genoma, la ORF6 y la ORF7, la homología entre aislados se sitúa en torno al 96%, pudiendo alcanzar el 100% en el caso de la ORF7 (Dea *et al.*, 2000). Por el contrario, la variabilidad de otras regiones, como la ORF5, es muy superior, habiéndose descrito un total de 9 linajes distintos cuando se utiliza esta zona para establecer las relaciones filogenéticas entre aislados (Shi *et al.*, 2010).

En el caso de los aislados de genotipo 1, aunque los primeros estudios realizados indicaban que la variabilidad genómica era mucho menor que en el caso del genotipo 2 (Suárez *et al.*, 1996b; Drew *et al.*, 1997; Le Gall *et al.*, 1998), esta idea se abandonó cuando se aumentó el número de aislados estudiados y el rango de países de origen de esos aislados. El primer estudio en el que se encontró una elevada variabilidad genómica entre aislados de genotipo 1 fue llevado a cabo por Forsberg *et al.* (2002), quienes estudiando aislados procedentes de distintos países de Europa Occidental observaron que, en los árboles filogenéticos, los aislados se distribuían en tres subgrupos en función de su origen geográfico. No obstante, la prueba definitiva de la elevada variabilidad genómica en los aislados del VSRRP de genotipo 1 la han aportado Stadejek *et al.* (2006) al describir la existencia de al menos 3 subtipos (posiblemente 4) en el genotipo 1. De estos subtipos, el subtipo 1 incluye todos los aislados que circulan en Europa Occidental y el resto están compuestos por distintos aislados de Europa del Este, indicando los resultados que la variabilidad del virus es muy superior en el este de Europa.

Finalmente, estudios sobre la evolución temporal de los aislados que circulan en la población porcina indican que la variabilidad parece aumentar con el paso del tiempo y que en la

población circulan coetáneamente aislados muy relacionados con otros que estuvieron presentes en la población en momentos anteriores y otros de nueva introducción, contribuyendo este hecho a aumentar la diversidad (Prieto *et al.*, 2009). Además, estos resultados indican que la asociación genómica y geográfica no tiene porqué ser cierta en todos los casos y que es posible que haya nuevas introducciones de aislados relaciones con otros de países diferentes, posiblemente como consecuencia del movimiento de animales infectados (Pesch *et al.*, 2005; Prieto *et al.*, 2009). La variabilidad genómica tan elevada observada entre aislados del VSRRP, con independencia del genotipo considerado, podría deberse a la tasa de mutación relativamente elevada que presenta el virus. Esta tasa se ha determinado para la ORF5 de diferentes aislados españoles, obtenidos en distintos años desde la aparición de la enfermedad, resultando una tasa de mutación de $3,3 \times 10^{-2}$ sustituciones por sitio y año (s/s/a) para los aislados modernos y de $1,1 \times 10^{-2}$ s/s/a para los aislados más antiguos (Prieto *et al.*, 2009). Resultados similares han sido encontrados cuando el análisis de la tasa de mutación se ha llevado a cabo sobre la ORF1, obteniendo valores de 10^{-2} s/s/a (Hanada *et al.*, 2005). Estos valores son superiores a los encontrados en la mayoría de los virus ARN (Prieto *et al.*, 2009).

1.2.2. VARIABILIDAD ANTIGÉNICA

Como consecuencia de la variabilidad genómica del VSRRP se han descrito importantes variaciones antigénicas entre distintos aislados, observándose diferencias más marcadas entre virus pertenecientes a distinto genotipo (Wensvoort *et al.*, 1992, 1993; Bautista *et al.*, 1993b). Estas diferencias en la composición antigénica se pueden encontrar en las distintas proteínas del virus. En este sentido, en el caso de la proteína de la nucleocápside, ya en los primeros estudios realizados se observó la existencia de epítomos conservados entre virus de genotipo 1 y de genotipo 2, junto con la presencia de epítomos comunes al genotipo 2 pero inexistentes en los aislados pertenecientes al genotipo 1 (Nelson *et al.*, 1993). El patrón de reactividad cruzada de distintos anticuerpos monoclonales frente a la proteína N ha confirmado, posteriormente, que aislados pertenecientes al mismo genotipo muestran epítomos altamente conservados que los diferencia de aislados del otro genotipo (Drew *et al.*, 1995; Magar *et al.*, 1995).

Esto mismo se ha observado en la GP3 que presenta epítomos diferentes en su región carboxi-terminal entre aislados pertenecientes a los genotipos 1 y 2 (Katz *et al.*, 1995), en la GP4 que ha demostrado ser antigénicamente diferente entre ambos genotipos (Zhang *et al.*, 1998), en la proteína M, en la que se ha puesto de manifiesto la falta de reactividad cruzada entre aislados de genotipo 1 y 2 del VSRRP (Magar *et al.*, 1997) y en la GP5 que también muestra una alta variabilidad antigénica entre aislados de genotipo 1 y 2 (Pirzadeh y Dea, 1997; Pirzadeh *et al.*, 1998).

A pesar de que las diferencias antigénicas más marcadas han sido puestas de manifiesto entre los diferentes genotipos del VSRRP, también se han encontrado diferencias entre aislados pertenecientes al mismo genotipo.

En referencia al genotipo 1, Drew *et al.* (1995) encontraron diferencias entre el patrón de reactividad cruzada de aislados británicos frente a monoclonales desarrollados frente a la proteína N de un aislado procedente también del Reino Unido. Incluso dos poblaciones víricas presentes en un mismo aislado holandés de genotipo europeo presentaron diferencias antigénicas importantes cuando se enfrentaron a anticuerpos monoclonales obtenidos frente a la proteína N del virus (Wieczorek-Krohmer *et al.*, 1996), y además difirieron en la inducción de AN al ser inoculadas en ratones (Weiland *et al.*, 1999).

Al igual que en el genotipo 1, en el genotipo 2 se ha podido constatar una gran variabilidad antigénica entre aislados. Se han descrito 4 grupos antigénicos diferentes dentro de este genotipo según su reactividad a anticuerpos monoclonales frente a la proteína N, y subdivisiones de estos grupos cuando se utilizaron anticuerpos monoclonales frente a la proteína GP3, M y GP5 (Yang *et al.*, 1999, 2000). Por otro lado, entre aislados coreanos de genotipo americano, Cheon y Chae (2000) pudieron describir seis patrones diferentes de reactividad cruzada usando monoclonales frente a la proteína GP5 y la proteína N.

Es más, la variabilidad antigénica observada entre aislados se ha puesto de manifiesto incluso entre un aislado europeo y su progenie tras uno o dos pases *in vivo*, observándose diferencias antigénicas en la proteína GP3, lo que sugiere un alto grado de mutación del virus durante la replicación en el hospedador, probablemente como mecanismo de evasión de la respuesta inmune (Le Gall *et al.*, 1997). Sin embargo, en el caso de la cepa americana VR-2332, y a pesar de encontrar variaciones genómicas en la progenie vírica de la misma al pasarla siete veces *in vivo*, no se pudo encontrar ningún cambio en ninguno de los epítomos reconocidos por una batería de anticuerpos monoclonales, ni en la sensibilidad de dicha progenie vírica a la neutralización (Chang *et al.*, 2002).

Toda esta variabilidad antigénica entre las diferentes proteínas estructurales del VSRRP, ha demostrado ser determinante en la diferente reactividad cruzada observada en ensayos de SN entre cepas del genotipo americano. Así, Kim *et al.* (2007, 2008), mediante la utilización de clones infecciosos, concluyen que la respuesta neutralizante está determinada por las proteínas GP3, M y GP5, siendo altamente específica frente a la cepa homóloga. En este sentido, estudios realizados en cepas pertenecientes al genotipo europeo han demostrado la existencia de un epítomo altamente variable en la GP4, que sería muy específico de la respuesta neutralizante homóloga al virus, siendo ineficaz la respuesta inducida por este frente a cepas heterólogas (Vanhee *et al.*, 2010).

No obstante, cuando se utiliza un número mayor de aislados no parece existir una relación entre los epítomos descritos hasta la fecha y la susceptibilidad a la neutralización que exhiben dichos aislados, por lo que se ha postulado que estos epítomos no son los responsables de una neutralización de amplio espectro y que posiblemente, estos epítomos sean conformacionales (Martínez-Lobo *et al.*, 2011b). Además, esta sensibilidad a la neutralización es muy variable entre cepas, lo que parece indicar una gran variabilidad antigénica frente a la seroneutralización (Martínez-Lobo *et al.*, 2011b).

Una de las consecuencias más relevantes de la variabilidad antigénica es la dificultad que plantea el control de la enfermedad, ya que es altamente improbable que vacunas basadas en una sola cepa del virus sean capaces de proteger eficazmente frente a un desafío heterólogo. De hecho, se ha postulado que el grado de eficacia de una vacuna dependerá en gran medida del grado de similitud existente entre la cepa vacunal y la cepa de desafío (Meng, 2000). Así, se ha demostrado que la protección que se consigue cuando el desafío se realiza con un aislado de genotipo contrario al utilizado en la inmunización es prácticamente nula (Labarque *et al.*, 2003a), aunque la falta de protección frente a un desafío heterólogo se puede producir también cuando la cepa de desafío es del mismo genotipo que la cepa vacunal (Labarque *et al.*, 2004). Es más, incluso entre aislados muy próximos desde el punto de vista genómico la protección obtenida suele ser sólo parcial, como se infiere de los resultados obtenidos cuando se han inmunizado animales con distintas vacunas comerciales frente al VSRRP y se han desafiado después con aislados del mismo grupo genómico y con elevada homología en la secuencia de la ORF5 (Prieto *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2006; Zuckermann *et al.*, 2007).

1.2.3. VARIABILIDAD PATOGENICA

Desde el aislamiento del VSRRP, se han observado diferencias en la virulencia de los distintos aislados, habiéndose descrito incluso aislados avirulentos (Ohlinger, 1992; Halbur *et al.*, 1995b, 1996a; Joo y Yoon, 1994; Mengeling *et al.*, 1996b).

Diversos estudios han demostrado que las diferencias de patogenicidad entre los distintos aislados del VSRRP se observa tanto en la forma reproductiva (Steverink *et al.*, 1999) como en la forma respiratoria de la enfermedad (Halbur *et al.*, 1995b, 1996b). Por otro lado, se han descrito presentaciones clínicas inusuales, como la comunicada por Rossow *et al.* (1999) que han asociado la aparición de síntomas nerviosos en lechones recién nacidos con el hallazgo del virus en el sistema nervioso de los animales.

Esta variabilidad patogénica ha llevado a la aparición de aislados de alta virulencia, los cuales han sido los responsables de los brotes atípicos de enfermedad en el campo que han cursado con manifestaciones clínicas graves, como una alta tasa de abortos y mortalidades muy elevadas en animales en crecimiento. Estos brotes se han localizado en orden cronológico en EE.UU., donde a finales del año 1996 se notificaron grandes pérdidas debidas a un fallo reproductivo en diversas explotaciones del Medio Oeste del país (Halbur y Bush, 1997; Mengeling *et al.*, 1997; Zimmerman *et al.*, 1997). Estos casos de SRRP atípico se han ido sucediendo en EE.UU. con un intervalo de 4 ó 6 años, habiéndose obtenido diferentes cepas de referencia como la cepa MN-184, aislada en el año 2000, o la cepa 1-8-82, aislada en el año 2007; las cuales han prevalecido en la población porcina probablemente debido a su patogenicidad (Yeske y Murtaugh, 2008; Murtaugh, 2009).

Por otro lado, entre los brotes de SRRP atípico, el que mayor incidencia ha tenido en la población porcina mundial ha sido el acaecido en China durante el año 2006, afectando a casi 2 millones de cerdos y causando la muerte de aproximadamente medio millón de animales, de los cuales se aislaron cepas del VSRRP pertenecientes al tipo 2. Posteriormente, este tipo de

cepas se ha distribuido rápidamente por los países productores de porcino del sudeste asiático, como Vietnam, Tailandia y Filipinas (Feng *et al.*, 2008).

Por último, en el caso de cepas de genotipo 1, también se han descrito diferencias entre la patogenicidad de los aislados. En primer lugar, se ha documentado la existencia de brotes atípicos de SRRP atribuidos a cepas europeas en el valle del Po, Italia (Martelli *et al.*, 2003). Posteriormente, se han identificado cepas de alta virulencia, similares a las previamente descritas en Norteamérica, habiéndose comprobado, a nivel experimental, como ciertas cepas pertenecientes al subtipo 3 poseen un comportamiento más patógeno que el observado en otras cepas de genotipo 1 (Karnychuk *et al.*, 2010; Morgan *et al.*, 2011).

En cuanto a las bases moleculares de la virulencia, todavía no se han determinado de forma fehaciente, aunque en los últimos años numerosos estudios han apuntado hacia ciertos cambios genéticos que podrían estar relacionados con la virulencia de ciertos aislados. En este sentido, uno de los fragmentos más estudiados ha sido la proteína nsp2 ya que los aislados altamente virulentos descritos en China presentan delecciones en este fragmento (Li *et al.*, 2007), lo cual ha permitido especular con la posibilidad de que esta región contenga factores determinantes de virulencia.

No obstante, el uso de clones infecciosos que permite la construcción de virus quiméricos, así como realizar delecciones y adiciones en el genoma del virus, ha sido clave para descartar el papel de las delecciones en la nsp2 en la virulencia de los aislados. Mediante una aproximación similar, Kwon *et al.* (2008) han determinado que es en el fragmento localizado entre la nsp3 y la nsp8 y en la ORF5 donde se localizan los mayores determinantes de virulencia, aunque también existen en los fragmentos que comprenden las proteínas nsp1 y 3, nsp10 y 12 y en la ORF2. Sin embargo, estudios recientes con cepas chinas altamente virulentas han descartado la participación de las proteínas estructurales en las características patogénicas de dichas cepas (Zhang *et al.*, 2009), mientras que Wang *et al.* (2008) han descrito que existen cambios de virulencia asociados a las regiones no traducibles del genoma, tanto en el extremo 5' como en el 3'.

Todo lo expuesto hasta aquí indica que, a pesar de los esfuerzos llevados a cabo, no ha sido posible descifrar los determinantes genéticos involucrados en la virulencia o atenuación de ninguna cepa del VSRRP (Murtaugh, 2009), por lo que parece que las bases genéticas de la virulencia son complejas, posiblemente multigénicas, e incluso podrían ser específicas de cepa, como ocurre en otros virus, como por ejemplo el virus de la gripe (Hoffmann *et al.*, 2005).

1.3.EPIDEMIOLOGÍA DEL VSRRP

El SRRP es una enfermedad ampliamente distribuida, cuya extensión se cree que fue debida principalmente al movimiento de animales infectados, desempeñando la vía aerógena un papel importante en la transmisión.

La estimación de la tasa de reproducción del VSRRP es considerada una herramienta útil para predecir el tiempo durante el cual podría circular el virus en una población, especialmente en el caso de granjas endémicamente infectadas. De hecho, la extinción espontánea de un virus en una población está principalmente determinada por la transmisibilidad del virus, la duración del periodo infeccioso y la existencia de cerdos susceptibles en la población. Nodelijk *et al.* en el año 2000 estimaron que la media de tiempo que tarda el VSRRP en desaparecer fue aproximadamente de seis años en una población cerrada de 115 cerdas mientras que fue de ochenta años en otra población cerrada de 230 cerdas. Estas estimaciones coinciden con los obtenidos por Evans *et al.* en el año 2010 que indicaban que la persistencia de la infección es más probable a medida que el tamaño del rebaño aumenta y cuando las cerdas de reposición no son aisladas correctamente del resto de cerdas de la granja. Además, la desaparición del VSRRP parece poco probable cuando la infección está instaurada en la sala de partos y lechones debido a la transmisión retrógrada desde las salas de cría y los animales de cebo a la población reproductora (Evans *et al.*, 2010).

La infección de animales susceptibles conduce a la eliminación del VSRRP por distintas secreciones: secreciones nasales (Rossow *et al.*, 1994), sangre, semen (Christopher-Hennings *et al.*, 1995a), saliva (Wills *et al.*, 1997b), orina (Rossow *et al.*, 1994), heces (Yoon *et al.*, 1993; Prieto *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2008), secreciones de la glándula mamaria (Wagstrom *et al.*, 2001) y secreciones oculares (Ramírez *et al.*, 2008).

La frecuencia y la duración de la eliminación son dependientes de la vía. Así, en secreciones nasales se ha detectado el virus hasta el día 38 p.i. (Rossow *et al.*, 1994) aunque el virus se suele encontrar en pocos animales y normalmente en los primeros días tras la infección (Rossow *et al.*, 1994; Prieto *et al.*, 1996a, 2004), en saliva a partir del día 10 p.i. y durante períodos muy prolongados de tiempo (Wills *et al.*, 1997b; Ramírez *et al.*, 2008), en orina hasta el día 28 p.i. (Rossow *et al.*, 1994), en heces hasta el día 35 p.i. (Yoon *et al.*, 1993) y en secreciones de la glándula mamaria hasta el día 9 p.i. (Wagstrom *et al.*, 2001).

Las secreciones oculares también se han descrito como una posible vía de eliminación, aunque sólo Ramírez *et al.* (2008) han detectado la presencia del virus en hisopos oculares mientras que otros autores han fracasado en la determinación del virus en esta muestra (Rossow *et al.*, 1994; Wills *et al.*, 1997b). Las diferencias se podrían deber a la presencia de una carga vírica muy baja en esta secreción, lo que justificaría el fracaso en la detección en función de la sensibilidad de la técnica utilizada a la vez que limitaría la importancia epidemiológica de esta ruta de transmisión, que requeriría un contacto muy estrecho entre los animales.

Por el contrario, la eliminación del virus en el semen, intermitente y de duración variable en función de factores individuales, como se ha constatado en animales infectados experimentalmente (Christopher-Hennings *et al.*, 1995a, 2001), parece tener una relevancia epidemiológica destacada ya que no sólo puede ser responsable de la infección de animales

susceptibles cubiertos con verracos infectados que estén eliminando el virus, sino que también puede ser responsable de la extensión de la infección a numerosas granjas como consecuencia de la inseminación de cerdas con semen procedente de centros de inseminación artificial infectados. De hecho, en noviembre del 2012, semen importado de Alemania fue identificado como el origen de la introducción del VSRRP en cinco poblaciones suizas de cerdos (Nathues *et al.*, 2014) aunque, afortunadamente, el brote fue detectado rápidamente y pudo ser controlado satisfactoriamente.

En cuanto a la transmisión de la enfermedad, hay que destacar que la transmisión directa, por contacto directo con animales infectados, es la forma mejor documentada de transmisión de la enfermedad entre granjas. Además de la transmisión por contacto directo, la transmisión vía aerógena se ha considerado una forma importante de transmisión en los primeros momentos tras la aparición de la enfermedad (Lager *et al.*, 2002; Mortensen *et al.*, 2002; Velasova *et al.*, 2012). Sin embargo, su implicación en el área de propagación de la misma parece controvertida ya que parece depender de la cepa del VSRRP y de diversos factores ambientales. Así, se ha observado que vientos de baja velocidad, bajas temperaturas, alta humedad relativa y bajos niveles de luz solar son factores que favorecen la propagación del VSRRP en el aire (Dee *et al.*, 2010). No obstante, el VSRRP también se transmite por otras vías, tales como la intranasal, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, oral y vaginal, siendo la dosis infectiva mínima distinta en función de la vía de transmisión (Hermann *et al.*, 2005) y, probablemente, de la edad del animal.

Además se transmite vía vertical, *in utero*, desde la madre a los embriones o fetos en desarrollo. Esta transmisión transplacentaria ha sido descrita desde prácticamente el momento de aparición de la enfermedad (Christianson *et al.*, 1992) habiéndose demostrado repetidamente en el último tercio de gestación (Christianson *et al.*, 1993; Mengeling *et al.*, 1994; Benfield *et al.*, 1997; Kranker *et al.*, 1998). Sin embargo, a pesar de que el efecto es mucho más marcado al final de la gestación, también al comienzo de la misma es posible que se produzca una infección transplacentaria (Lager *et al.*, 1994). No obstante, este fenómeno se observa cuando se ha producido la placentación y se ha establecido una clara relación materno-filial ya que los embriones antes de la implantación no parecen ser susceptibles a la infección por el VSRRP ni *in vivo* (Prieto *et al.*, 1997a) ni *in vitro* (Prieto *et al.*, 1996a).

Por otra parte, se ha estudiado tanto el papel que juegan los fómites en la transmisión de la enfermedad (Otake *et al.*, 2002a; Dee *et al.*, 2002, 2003) como los vectores biológicos (Otake *et al.*, 2003a, b, c). En el primer caso, se ha llegado a la conclusión de que no son muy relevantes a pesar de haberse documentado la transmisión del virus por medio de utillaje, agujas, y camiones (Otake *et al.*, 2002a; Dee *et al.*, 2002, 2003) y en el segundo caso, Schurrer *et al.* en el 2005 demostraron que las moscas domésticas pueden albergar el virus hasta 48 horas aunque en ellas no se replica el VSRRP. Además, se ha demostrado que mosquitos *Aedes* spp. y moscas domésticas alimentados de forma interrumpida en cerdos virémicos y que terminan su alimentación en cerdos sanos son capaces de transmitir mecánicamente la enfermedad (Otake *et al.*, 2003a, b, c). Estos estudios sugieren que mosquitos y moscas podrían contribuir en la transmisión del virus entre cerdos y, probablemente, en la propagación del mismo a granjas vecinas (Moon, 2002; Schurrer *et al.*, 2006). Sin embargo, a pesar de la importancia de estos datos, requieren una cuidadosa interpretación ya que los

estudios anteriormente descritos usan modelos de exposición artificiales no imitando las condiciones de campo. Por otro parte, los movimientos de las moscas entre las distintas granjas están limitados por varios factores como la existencia de sistemas de ventilación y filtros y las condiciones ambientales (Otake *et al.*, 2004). Es por ello por lo que la implicación de los artrópodos en la transmisión del VSRRP entre granjas se considera menor e incluso cuestionable.

También se ha observado que ratas, ratones y pájaros, no son susceptibles al VSRRP. Sin embargo, de manera puntual, Zimmerman *et al.* en 1997 describieron que este virus se replicaba en Ánades (*Anas platyrhynchos*) sin que ningún otro estudio haya podido confirmar ésto (Trincado *et al.*, 2004a) y, por tanto, se considera que las aves no están involucradas en la epidemiología del VSRRP.

De hecho, junto con los cerdos domésticos, sólo los cerdos salvajes son susceptibles a la infección por el VSRRP, siendo confirmada la infección mediante RT-PCR en jabalíes de Italia (Bonilauri *et al.*, 2006), Alemania (Reiner *et al.*, 2009) y Eslovaquia (Vilcek *et al.*, 2015) y encontrándose evidencias serológicas en Croacia (Roic *et al.*, 2012), Francia (Albina *et al.*, 2000), Alemania (Oslage *et al.*, 1994) y Estados Unidos (Baroch *et al.*, 2015). No obstante, la detección en jabalíes de cepas del VSRRP similares a las vacunas vivas comerciales indican que, probablemente, el virus ha sido transmitido de cerdos domésticos a jabalíes salvajes (Reiner *et al.*, 2009; Vilcek *et al.*, 2015) y por ello, el papel que juegan los jabalíes salvajes en el área de propagación del VSRRP podría considerarse de limitada relevancia.

Por otra parte, ha sido evaluado el riesgo de introducción del SRRP en países libres de enfermedad a través de importaciones de carne y productos porcinos contaminados. En este caso, podría producirse la infección de cerdos tras la ingestión de carne negativa por aislamiento del virus pero positiva mediante RT-PCR (Magar y Laroche, 2004; Van Der Linden *et al.*, 2003b). Sin embargo, después de la manipulación posterior al sacrificio convencional y la congelación o tras la fabricación tradicional de los productos porcinos, la cantidad de VSRRP infeccioso en estos productos es muy baja o incluso insignificante (Van Der Linden *et al.*, 2003b). Por lo tanto, la probabilidad de introducir la enfermedad en países libres de VSRRP a través de importaciones de carne o productos porcinos es limitada aunque debe tenerse en cuenta (Hall y Neumann, 2013).

Al igual que otros miembros de la familia *Arteriviridae*, el VSRRP se caracteriza por ser capaz de producir infecciones persistentes que se definen como una replicación continuada, en baja proporción, durante largos períodos de tiempo en los lugares de acantonamiento (Allende *et al.*, 2000) y que parecen ser el resultado de la incapacidad del sistema inmune de los animales afectados para eliminar el virus presente en dichos lugares de acantonamiento.

Así, el virus ha podido ser aislado de lechones infectados experimentalmente hasta 157 días después de la inoculación (Wills *et al.*, 1997a) y se ha detectado mediante RT-PCR hasta 251 días después de la infección (Wills *et al.*, 2003). En cambio en individuos adultos se ha aislado el virus hasta el día 70 p.i., y se han obtenido positivos mediante RT-PCR en lavados pulmonares y en órganos hasta el día 100 p.i. (Bierk *et al.*, 2001b; Christopher-Hennings *et al.*, 1995a). Estos animales persistentemente infectados pueden transmitir el virus a animales

susceptibles durante largos periodos de tiempo. Se ha descrito la transmisión hasta 22 semanas después de la infección en lechones, y hasta 99 días después en animales adultos (Albina *et al.*, 1994; Zimmerman *et al.*, 1992), aunque en la mayoría de los estudios la transmisión ha quedado limitada a los dos primeros meses p.i. (Bierk *et al.*, 2001b; Wills *et al.*, 2003).

La persistencia de la infección juega un papel muy importante en la supervivencia del virus y la transmisión de la infección dentro de una población, convirtiéndose en uno de los obstáculos más importantes para el control de la enfermedad. Además, estos animales portadores no muestran ninguna sintomatología asociada a su estado de portador y su detección es muy complicada ya que el virus permanece en diversos tejidos tras el cese de la viremia, siendo difícil realizar un correcto muestreo para la detección del virus en estos animales (Wills *et al.*, 1997a; Bierk *et al.*, 2001a, b; Wills *et al.*, 2003). De hecho un estudio llevado a cabo en Ontario por Thakur *et al.* en el 2015 indicaron que el movimiento de animales de una granja a otra puede dar lugar a brotes en granjas previamente negativas. Además, tampoco la respuesta serológica permite diferenciar animales portadores y no portadores e incluso se ha detectado la existencia de animales portadores seronegativos por ELISA (Horter *et al.*, 2002; Batista *et al.*, 2004). Por ello, la introducción de dichos animales infectados subclínicamente es considerada la ruta principal por la cual se introduce el virus (Carlsson *et al.*, 2009; Mortensen *et al.*, 2002; Thakur *et al.*, 2015).

1.4. PATOGENIA

1.4.1. DISTRIBUCIÓN ORGÁNICA DEL VIRUS

El virus suele entrar en el organismo por la vía oro-nasal, contactando en primer lugar con el epitelio de la mucosa nasal y orofaríngea. A partir de estas localizaciones, alcanza de forma muy rápida sus células diana, los macrófagos alveolares (MAPs) (Duan *et al.*, 1997; Lawson *et al.*, 1997) en los cuales se replica.

De forma inmediata, comienza un proceso de viremia mediante el cual el virus se disemina por el organismo. En este compartimento el virus se encuentra, mayoritariamente, en forma libre (Rossow *et al.*, 1995), aunque también se puede encontrar asociado a monocitos. Por otro lado, se ha especulado con la posibilidad de que el virus utilice también la vía linfática para su distribución orgánica.

El proceso de distribución orgánica permite la detección del virus en prácticamente cualquier localización orgánica. De esta forma, tras la infección, el virus se ha encontrado en la mucosa nasal y las glándulas serosas del epitelio nasal (Halbur *et al.*, 1996a; Rossow *et al.*, 1996; Ramirez *et al.*, 2008), el epitelio traqueal (Park *et al.*, 1996) y bronquial (Pol *et al.*, 1991), el corazón (Rossow *et al.*, 1994; Halbur *et al.*, 1996a; Christopher-Hennings *et al.*, 1998), el hígado (Halbur *et al.*, 1996a; Prieto *et al.*, 2004), el riñón (Halbur *et al.*, 1996a), las glándulas adrenales (Halbur *et al.*, 1996a), el sistema nervioso central (Rossow *et al.*, 1999; Shin *et al.*, 1996) y distintos órganos del aparato reproductor incluyendo los testículos, distintas localizaciones del epidídimo, el conducto deferente, las glándulas bulbouretrales y vesiculares,

la próstata y el pene (Christopher-Hennings *et al.*, 1998; Prieto *et al.*, 2004), los folículos ováricos (Sur *et al.*, 2001), el endometrio, los sitios de implantación fetal y la placenta (Karniychuk *et al.*, 2011). No obstante, las localizaciones preferentes del virus son el pulmón (Bierk *et al.*, 2001b) y órganos del aparato linforreticular, incluyendo distintos nódulos linfáticos, entre los que destacan los submandibulares, inguinales superficiales, mesentéricos, testiculares, paratraqueales y mediastínicos (Rossow *et al.*, 1994, 1995; Halbur *et al.* 1996a; Prieto *et al.*, 2003, 2004; Martínez-Lobo *et al.*, 2011a), la tonsila (Halbur *et al.*, 1996a; Wills *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2003; Martínez-Lobo *et al.*, 2011a), el timo (Halbur *et al.*, 1996a; Prieto *et al.*, 2003; Martínez-Lobo *et al.*, 2011a); el bazo (Rossow *et al.*, 1994, 1995; Halbur *et al.*, 1996a; Prieto *et al.*, 2003; Martínez-lobo *et al.*, 2011a) y las placas de Peyer en el ileon (Halbur *et al.*, 1996a; Prieto *et al.*, 2004; Martínez-Lobo *et al.*, 2011a).

A pesar de su abundante distribución orgánica, el virus se replica únicamente en MAP, algunos monocitos (Voicu *et al.*, 1994), células dendríticas (Halbur *et al.*, 1996a) y algunas poblaciones de macrófagos de los nódulos linfáticos (Duan *et al.*, 1997). Asimismo, el virus se ha detectado esporádicamente en neumocitos tipo II, aunque en este caso no se ha confirmado la replicación vírica en este tipo celular (Halbur *et al.*, 1996a).

En cuanto a la patogenia molecular del VSRRP, se sabe que en la infección de sus células diana intervienen múltiples receptores, en su mayoría glicosilados (Wissink *et al.*, 2003) como es el sulfato de heparina y, principalmente, el ácido siálico situado en el extremo N-terminal de la sialoadhesina (Vanderheijden *et al.*, 2003; Delpitte *et al.*, 2004a, 2005, 2006). Se piensa que el virus contacta con los MAPs a través del heparán sulfato de la superficie de la célula, interaccionando, posteriormente, de una forma más estable con la sialoadhesina (Van Breedam *et al.*, 2010). La interacción del virus con el receptor consiste en la unión del heterodímero GP5/M del virus al extremo N- terminal de la sialoadhesina, desempeñando el ácido siálico presente en este extremo N- terminal un papel muy importante en la interacción (Van Breedam *et al.*, 2010). Existe evidencia de que el VSRRP penetra en la célula mediante endocitosis dependiente de pH (Kreutz *et al.*, 1996; Nauwynck *et al.*, 1999) y vía clatrina (Van Breedam *et al.*, 2010) y, una vez internalizado, el genoma del virus se liberaría al citoplasma, desconociéndose cómo se produce esta liberación (Van Breedam *et al.*, 2010), aunque se sabe que tiene lugar cuando el virus está presente en el endosoma temprano y que se trata de un mecanismo dependiente de la acidificación del endosoma (Kreutz *et al.*, 1996; Nauwynck *et al.*, 1999; Van Breedam *et al.*, 2010) y del receptor CD163 (Van Breedam *et al.*, 2010), el cual podría requerir la interacción con las proteínas del virus GP2 y GP4 para la liberación del genoma y depender de un dominio funcional de este receptor (SRCR 5) (Van Breedam *et al.*, 2010). Por otra parte, parece que la catepsina E y una proteasa, todavía no identificada y similar a la tripsina, están implicadas en este proceso (Van Breedam *et al.*, 2010). Una vez dentro de la célula, la replicación del virus en las células hospedadoras es muy rápida, de tal forma que se puede detectar antígeno vírico en el citoplasma de las células infectadas a las 6 horas p.i. y partículas ensambladas a las 9 horas p.i., liberándose la primera progenie vírica entre las 9 y las 12 horas p.i. (Pol *et al.*, 1997). Esta liberación se produce mediante la lisis de la célula infectada, induciendo procesos de apoptosis en las células adyacentes (Sur *et al.*, 1997, 1998; Sirinarumitr *et al.*, 1998). Estos procesos de apoptosis, así como la liberación de citoquinas como la IL-1 y la IL-10 por parte de los macrófagos infectados parecen tener un

papel relevante en la patogénesis de la enfermedad, en especial en las lesiones observadas en los pulmones de los animales afectados (Sirinarumitr *et al.*, 1998; Van Reeth y Nauwynck, 2000; Labarque *et al.*, 2003b).

1.4.2. PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD RESPIRATORIA

La patogenia de la enfermedad respiratoria causada por el VSRRP no está completamente elucidada, aunque en la misma podrían intervenir distintos factores. El principal componente se cree que es la replicación del virus en los MAPs, que produce una destrucción masiva de los mismos, causando una disminución en su número que puede llegar hasta el 40% en la primera semana p.i. (Molitor *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 1992; Molitor, 1993). Asimismo, la infección por el VSRRP produce una alteración en la funcionalidad de los macrófagos, que ven disminuida su capacidad de liberación de superóxido y su capacidad fagocítica y experimentan una supresión del NADPH (Molitor, 1993).

El segundo componente importante en la patogenia de la enfermedad respiratoria sería la liberación de citoquinas y sustancias biológicamente activas por los macrófagos activados, lo que causaría un proceso inflamatorio, con la infiltración de células inflamatorias en el pulmón (Van Reeth *et al.*, 2000). Se ha descrito que citoquinas como la IL1, IL6, IFN y TNF α son secretadas por los macrófagos alveolares con efectos beneficiosos para la defensa del organismo frente a la infección, pero también con efectos perjudiciales para el mismo, como sería esta reacción inflamatoria, mencionada anteriormente, y el daño tisular que producen cuando están sobreexpresadas (Liu *et al.*, 2010). Este infiltrado inflamatorio sería el responsable de la disnea y el eritema cutáneo que caracterizan a la enfermedad (Rossow *et al.*, 1995), puesto que ha sido descrita la liberación de prostaglandina E₂ (PGE₂) a partir de estas citoquinas (Matsumura *et al.*, 1992; Saper y Breder, 1994) y esta PGE₂ es capaz de inducir inflamación local con angiotelectasia y un incremento de la permeabilidad (Liu *et al.*, 2010) originando este eritema cutáneo característico. Además, se ha observado que cerdos infectados por una cepa del virus altamente patogénica presentan niveles mayores de citoquinas inflamatorias que cuando son infectados por cepas menos patogénicas y que existe una correlación directa entre estos niveles de citoquinas y los daños en tejidos y órganos (Liu *et al.*, 2010).

Como consecuencia de los fenómenos anteriormente descritos, el mecanismo de defensa respiratorio se puede ver disminuido, de forma transitoria, durante un período de hasta 4 semanas, momento en que la funcionalidad de los macrófagos está completamente recuperada (Molitor, 1993; Done y Paton, 1995).

1.4.3. EFECTO DEL VSRRP EN CERDAS

El virus alcanza el aparato reproductor, tras su diseminación orgánica, y desarrolla la sintomatología característica de esta enfermedad. También la enfermedad puede transmitirse de forma venérea tanto si se utiliza la inseminación artificial con semen infectado (Gradil *et al.*, 1996; Lager *et al.*, 1996b; Prieto *et al.*, 1997b) como si se cubren cerdas con verracos infectados (Yaeger *et al.*, 1993; Swenson *et al.*, 1995).

Karniychuk et al. (2011) propusieron una hipótesis como modelo de replicación del VSRRP en los sitios de implantación fetal, y por tanto, como modelo de infección transplacentaria. Según esta, el VSRRP replicaría en macrófagos intravasculares susceptibles que se adhieren a células endoteliales de los vasos endometriales. Posteriormente, atravesaría el epitelio maternal y la capa trofoblástica aunque se desconoce el mecanismo puesto que el VSRRP siempre está asociado a macrófagos con receptores CD163 y de sialoadhesina y, además, en principio, ni el epitelio maternal ni los trofoblastos son susceptibles a la replicación del VSRRP. Por ello, estos autores proponen que atraviesen estas capas asociados a macrófagos maternos. Por otra parte, se ha observado que el porcentaje de células infectadas por el VSRRP, dentro de la población de macrófagos con receptores de sialoadhesina y CD163, es significativamente mayor en la placenta (40%) que en el endometrio (0,9%) y esto lleva a pensar que, una vez en la placenta fetal, el VSRRP aumenta su eficiencia de replicación. Las razones propuestas por estos autores, y que podrían explicar la restricción de la replicación del VSRRP en el endometrio y la alta eficacia de la misma en la placenta fetal, son varias e incluyen que los macrófagos endometriales pudieran ser más refractarios a la infección por el VSRRP, que la respuesta inmune materna sería más madura y, por tanto, capaz de eliminar eficientemente los macrófagos infectados y restringir, de esta manera, la replicación del virus en el endometrio o que la replicación del virus en la placenta fetal podría alcanzar la expresión de proteínas en los macrófagos locales y predisponerlos a la infección del VSRRP. Así, finalmente, alcanza los órganos fetales internos a través de la sangre fetal, de forma libre o asociado a macrófagos, encontrándose un ambiente favorable para su replicación, puesto que ya este mismo grupo en el 2009, observó la presencia abundante de sus células diana (macrófagos con receptores de sialoadhesina y CD163) en los órganos fetales.

Se ha descrito, además, que la importancia de la infección al comienzo de la gestación es relativamente menor comparada con los efectos al final de la misma. Las causas de estas diferencias en el efecto de la infección a lo largo de la gestación no han sido completamente dilucidadas, pero se podrían deber a dos factores. El primero de ellos sería una mayor susceptibilidad de los fetos a la infección al avanzar en su desarrollo, como se comentó anteriormente (Karniychuk y Nauwynck, 2009; Mateusen *et al.*, 2007), mientras que el segundo se debería al mayor contacto materno filial según avanza la gestación (Prieto *et al.*, 1997a). Además, la falta de susceptibilidad de los embriones al comienzo de la gestación por la protección de la *zona pellucida* o bien la falta de susceptibilidad de los blastómeros hasta que se produce la diferenciación celular a lo largo del desarrollo embrionario (Prieto *et al.*, 1996a, 1997a, 1997b) también podría guardar relación con este hecho.

A pesar de ello, una vez producida la placentación, el virus puede infectar embriones y fetos en desarrollo y causar la muerte de al menos parte de ellos (Prieto *et al.*, 1997a), habiéndose descrito la posibilidad de que se produzcan abortos tempranos debidos a la infección por parte del VSRRP (Lager *et al.*, 1994). Por lo tanto, la infección transplacentaria dependerá de la relación materno fetal y, por ello, de lo avanzada que se encuentre la gestación, observándose fallo reproductivo sistémico cuando la infección sucede a partir de los 85 días de gestación y aumentando la tasa de nacidos muertos y la mortalidad pre destete con el avance de la misma (Mengeling *et al.*, 1994; Lager *et al.*, 1996a).

1.4.4. EFECTO DEL VSRRP EN EL VERRACO

Al igual que ocurría en la cerda, tras su diseminación orgánica, el VSRRP alcanza el aparato reproductor libre o asociado a monocitos o macrófagos. Durante la fase aguda de la infección el virus está presente en la mayoría de órganos del aparato reproductor masculino, incluyendo el testículo, el epidídimo, el conducto deferente, el pene y todas las glándulas accesorias (i.e. glándulas bulbouretrales, vesículas seminales y próstata) (Christopher-Hennings *et al.*, 1998; Prieto *et al.*, 2003). No obstante, en el testículo la presencia del VSRRP se limita a los primeros momentos p.i., habiéndose descrito la replicación del virus en los macrófagos intersticiales y en las células germinales de los túbulos seminíferos (Sur *et al.*, 1997; Prieto *et al.*, 2003). Por el contrario, la presencia del virus es más frecuente en el epidídimo de los verracos infectados, habiéndose descrito una localización preferente en la cabeza del epidídimo, zona en la que es más abundante la presencia de macrófagos como consecuencia de diferencias en la vascularización de esta región anatómica (Prieto *et al.*, 2003). Este hallazgo, unido al hecho de que el virus se puede encontrar presente en el eyaculado de verracos vasectomizados, en los que no hay espermatozoides pero sí macrófagos procedentes de las distintas secreciones que constituyen el líquido seminal (Christopher-Hennings *et al.*, 1998), ha permitido elaborar la teoría de que el virus presente en el eyaculado de los verracos infectados es consecuencia, muy probablemente, de la presencia de macrófagos infectados que llegan al aparato reproductor y son eliminados con el eyaculado de los animales (Prieto y Castro, 2005). Esta teoría permitiría explicar también la eliminación intermitente de virus que se ha observado en infecciones experimentales (Christopher-Hennings *et al.*, 1995a, b, 2001) ya que la presencia del virus en el eyaculado dependería de que al mismo llegaran o no macrófagos infectados procedentes de los lugares de acantonamiento del virus en distintos órganos linfoides.

Por otro lado, en condiciones de campo se ha observado que la infección por el VSRRP puede producir alteraciones de la calidad espermática, que se han reproducido en infecciones experimentales, aunque se ha observado que presentan un marcado componente individual, con la existencia de animales en los que no se observa efecto alguno mientras que en otros verracos se pueden apreciar alteraciones que pueden ser significativas (Prieto *et al.*, 1996b). Estas alteraciones se caracterizan por una disminución en el porcentaje de espermatozoides móviles, un aumento de las morfoanomalías (especialmente por la presencia de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales y distales) y por un aumento en el porcentaje de espermatozoides con alteraciones del acrosoma. Aunque no se conocen las causas que las provocan, se ha descrito que el virus puede causar muerte por apoptosis de las células germinales (Sur *et al.*, 1997), lo cual podría justificar las alteraciones moderadas y transitorias en la calidad espermática que se observan en algunos verracos.

1.5.SINTOMATOLOGÍA Y LESIONES

La sintomatología que se observa tras la infección puede tener una gravedad muy variable (Done y Paton, 1995), la cual se ha atribuido a distintos factores. El primero de ellos se relaciona con las características del aislado implicado en el brote ya que se ha constatado que existen diferencias importantes tanto en virulencia como en tropismo entre aislados (Halbur *et al.*, 1996b). El resto de factores que modulan la gravedad de los síntomas derivados de la infección se relacionan con características propias de la explotación afectada, como el nivel de inmunidad previo de la población (Wensvoort, 1993); el tipo y características de los agentes patógenos presentes de forma endémica en la explotación, que son responsables de las infecciones secundarias que se asocian a los brotes de enfermedad; y el manejo (Polson, 1996) y tamaño de la explotación. Así, se ha descrito una menor incidencia de alteraciones en la reproducción en explotaciones que trabajan en sistemas de “todo dentro - todo fuera” (Goldberg *et al.*, 2000a) y un aumento tanto en la mortalidad de cerdas como en la gravedad de la enfermedad respiratoria en los animales en crecimiento directamente proporcional al tamaño de la explotación (Goldberg *et al.*, 2000a). No obstante, y a pesar de la diversidad de manifestaciones clínicas que pueden acompañar a la infección de la población por este virus, en la mayoría de los casos, se observa, en los primeros momentos tras la infección, una sintomatología sistémica caracterizada por la presencia de animales con anorexia, pirexia y depresión que rara vez afecta a más del 30% de la población (Meldrum, 1991; Blackburn, 1991; Loula, 1991). Al cabo de dos o tres semanas empiezan a observarse alteraciones en la reproducción, que pueden durar un tiempo variable, en función de los factores anteriormente mencionados, pero que suelen durar unos cinco o seis meses en la mayoría de los brotes (De Jong *et al.*, 1991; Loula, 1991; Hopper *et al.*, 1992).

Tras la forma aguda de la enfermedad se establece en la explotación la forma endémica o crónica que se mantiene durante un largo período de tiempo y que varía en función del tamaño y el manejo en la granja (Stevenson *et al.*, 1993). La sintomatología característica de esta forma endémica es de tipo respiratorio, afectando, principalmente, a los animales en crecimiento en los que produce una alteración de los parámetros productivos y un aumento de las infecciones secundarias (Pejsak *et al.*, 2000; Beilage y Beilage, 2003; Drolet *et al.*, 2003). Además, de forma esporádica, se pueden producir alteraciones en la reproducción (Dee y Joo, 1994).

1.5.1. SINTOMATOLOGÍA ASOCIADA A LA REPRODUCCIÓN

En las reproductoras, la infección, además de causar la sintomatología sistémica anteriormente mencionada, puede dar lugar a un fallo en la reproducción cuya incidencia se relaciona directamente con el momento de la gestación en el que se infecten los animales. Así, cuando las cerdas se infectan al comienzo de la gestación o en el segundo tercio de la misma no se suele producir un fallo de la reproducción, siendo raros los casos de pérdidas tempranas de gestación o abortos antes del día 80 ó 90 de gestación. Sin embargo, cuando la infección tiene lugar al final de la gestación, la incidencia de fallos en la reproducción aumenta de forma muy significativa. Como consecuencia, los brotes de la enfermedad en las reproductoras suelen caracterizarse por un aumento en el porcentaje de abortos tardíos y de partos prematuros.

Además, tanto en los partos prematuros como en los partos a término, las camadas afectadas suelen contener una mezcla de lechones nacidos muertos, fetos que han muerto como consecuencia de la infección y se encuentran en distintos grados de autólisis, lechones nacidos débiles, que suelen ser de pequeño tamaño y tienen dificultades para encontrar tanto la ubre de la cerda como el nido, y lechones aparentemente normales (De Jong *et al.*, 1991; Loula, 1991; Hopper *et al.*, 1992).

Además, y debido en gran medida a la presencia de un elevado número de lechones nacidos débiles, la mortalidad en lactación es muy elevada (Rossow *et al.*, 1994), lo que conduce a una disminución considerable en el número de lechones destetados por camada durante un brote. La elevada mortalidad en lactación suele ser consecuencia del aumento en la incidencia de diarreas, que tienen su origen en un encalostramiento inadecuado de los lechones y en una alimentación irregular (Blackburn, 1991; Hopper *et al.*, 1992), aunque también se observa en algunos casos, sobre todo si la infección se debe a un aislado de genotipo 2, la presencia de signos clínicos respiratorios caracterizados sobre todo por la presencia de disnea y respiración abdominal.

En el verraco la infección da lugar a la aparición de los signos clínicos de naturaleza sistémica descritos anteriormente, como anorexia, depresión y letargia, así como a una pérdida de la libido (Feitsma *et al.*, 1992; Hopper *et al.*, 1992). Por otra parte, en condiciones de campo se ha observado que la infección por el virus puede producir alteraciones en la calidad espermática, que dan lugar a una disminución en el número de dosis producidas en los centros de inseminación artificial a partir de la segunda semana p.i. (De Jong *et al.*, 1991; Feitsma *et al.*, 1992). No obstante, en los estudios experimentales llevados a cabo no ha sido posible reproducir de forma sistemática este efecto ya que, algunos estudios muestran únicamente alteraciones leves en la calidad espermática, incluyendo cambios en el volumen, el pH o la concentración espermática del eyaculado (Swenson *et al.*, 1994; Yaeger *et al.*, 1993; Shin *et al.*, 1995), mientras que otros han encontrado alteraciones más extensas, incluyendo disminuciones en el porcentaje de espermatozoides móviles, aumentos en las morfoanomalías y alteraciones en los acrosomas (Prieto *et al.*, 1996b; Teuffert *et al.*, 1995; Shin *et al.*, 1997; Hutchinson *et al.*, 1997; Christopher-Hennings *et al.*, 1997). Sin embargo, las alteraciones en la calidad espermática observadas presentan un componente individual muy marcado (Prieto *et al.*, 1996b) y este hecho podría explicar las diferencias observadas en los distintos estudios realizados.

1.5.2. SINTOMATOLOGÍA EN ANIMALES EN CRECIMIENTO

El tipo de sintomatología observada en los animales en crecimiento, así como la gravedad de la misma, puede ser muy variable. En general, el resultado clínico de la infección va a depender de distintos factores, algunos propios del aislado del virus que causa la infección, otros propios del hospedador y algunos derivados de las condiciones de producción. En relación con las características inherentes a los aislados que causan la infección, se sabe que éstos difieren en su virulencia, habiéndose demostrado diferencias muy marcadas en la gravedad de los síntomas observados en animales infectados experimentalmente (Halbur *et al.*, 1995b, 1996b). Además, se ha descrito recientemente que el tipo de signos clínicos que se observan tras la inoculación experimental de cerdos en crecimiento depende del genotipo al que pertenezca el

aislado utilizado para infectar a los animales, siendo más neumotropos los virus de genotipo 2 que los de genotipo 1 (Martínez-Lobo *et al.*, 2011a). Igualmente, y en relación con el hospedador, el resultado clínico de la infección dependerá en gran medida de la edad a la que se infecten los animales, siendo como regla general la infección más grave en los animales más jóvenes (Rossow *et al.*, 1994) y más leve, pudiendo llegar a cursar de forma asintomática, en los animales de más edad. Finalmente, el cuadro clínico que se observe en las explotaciones infectadas vendrá condicionado también por el tipo y las características de otros agentes patógenos endémicos en esas explotaciones que condicionarán el tipo de infecciones secundarias que preponderen en cada granja.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente mencionado, se puede decir que la sintomatología más grave se produce cuando la infección tiene lugar *in utero* o poco después del nacimiento. En este momento, además de los signos inespecíficos característicos de la infección por el virus, como fiebre y letargia, se pueden observar otros que incluyen la presencia de edema palpebral, conjuntivitis, rinitis, polipnea y disnea (Rossow *et al.*, 1994, 1995; Halbur *et al.*, 1996a, b). Sin embargo, cuando la edad de los animales aumenta, es frecuente observar únicamente signos sistémicos como fiebre, letargia y anorexia, especialmente si el aislado causante de la infección es de genotipo 1 (Martínez-Lobo *et al.*, 2011a). Esto hace que tanto los signos clínicos como las pérdidas más destacadas se deban a la infección por agentes secundarios, lo cual complica la identificación de la etiología de los cuadros clínicos observados, que serán muy variables dependiendo de los agentes implicados en el proceso y la edad de los animales, y con frecuencia pone en duda el papel real que la infección por el virus juega en el proceso, dificultando así el cálculo del coste que la infección por el virus tiene en animales en crecimiento.

1.5.3. LESIONES

Las lesiones macroscópicas observadas en animales infectados por el VSRRP, siempre que no haya complicaciones secundarias por otros patógenos, son muy moderadas, en ningún caso patognomónicas de la enfermedad y en muchos casos inexistentes (Done *et al.*, 1992). Lo mismo sucede con los cambios histológicos, que suelen ser mínimos y limitados al aparato respiratorio, salvo que existan complicaciones.

Cuando existen, las lesiones macroscópicas se caracterizan por la aparición de zonas de consolidación pulmonar multifocal (Halbur *et al.*, 1995b), especialmente marcadas en la zona ventral de los lóbulos medios y el lóbulo accesorio (Ramos *et al.*, 1992); edema interlobular en el pulmón, y edema, congestión e hiperplasia de los nódulos linfáticos (Pol *et al.*, 1991; Halbur *et al.*, 1995a; Vézina *et al.*, 1996; Mengeling *et al.*, 2003a). En los lechones nacidos débiles y en los nacidos muertos se encuentran con frecuencia hidrotórax y ascitis (Plana *et al.*, 1992), junto con la presencia de extensas hemorragias subcutáneas (Scruggs y Sorden, 2001).

Además, los fetos de camadas infectadas suelen estar cubiertos de una capa espesa y amarillada constituida por una mezcla de meconio y líquido amniótico, indicativa de estrés fetal y/o hipoxia (Lager y Halbur, 1996) y pueden aparecer hemorragias o edemas en el cordón umbilical, que pueden sufrir un aumento notable de tamaño (Lager y Halbur, 1996).

Finalmente, recientemente se ha documentado la aparición de lesiones de tipo hemorrágico en animales afectados por cepas chinas de alta virulencia. Estas lesiones son con frecuencia multiorgánicas, destacando la existencia de extensas hemorragias en el bazo, hígado, riñón y nódulos linfáticos (Tian *et al.*, 2007).

En cuanto a las lesiones microscópicas, las más destacadas se circunscriben al aparato respiratorio. Algunos estudios han descrito la presencia de rinitis caracterizada por la pérdida de los cilios en las células epiteliales, vacuolización de las mismas y descamación de la superficie del epitelio (Pol *et al.*, 1992; Collins *et al.*, 1992; Rossow *et al.*, 1992). Sin embargo, lo más característico es la aparición de una neumonía intersticial proliferativa multifocal caracterizada por una hipertrofia y una hiperplasia de los neumocitos de tipo II, una infiltración moderada en los septos alveolares de células mononucleares y un acúmulo de macrófagos, detritus celulares y células inflamatorias en los espacios alveolares y las vías aéreas bajas (Halbur *et al.*, 1994, 1995a; Rossow *et al.*, 1994, 1995).

En el aparato linforreticular se ha descrito una linfadenopatía caracterizada por la hipertrofia y la hiperplasia de los centros germinales de los nódulos linfáticos, el bazo y las tonsilas, acompañadas de una necrosis folicular y un aumento en el número de macrófagos en los sinusoides (Rossow *et al.*, 1994; Halbur *et al.*, 1995a), así como hemorragias subcapsulares en los nódulos linfáticos (Rossow *et al.*, 1995).

Otras lesiones descritas, aunque no de forma constante, incluyen miocarditis multifocal (Rossow *et al.*, 1994; Halbur *et al.*, 1995a), encefalitis difusa no supurativa (Collins *et al.*, 1992) y meningoencefalitis grave (Rossow *et al.*, 1999).

En cuanto al aparato reproductor del verraco se ha descrito una despoblación celular, con descamación de los túbulos seminíferos, la formación de células germinales anormales, incluyendo espermatogonias primordiales y células gigantes multinucleadas, junto con la muerte de células germinales, todo ello producido por procesos apoptóticos debidos a la replicación vírica (Sur *et al.*, 1997).

En relación con las lesiones en el aparato reproductor femenino, se han observado alteraciones en la placenta, incluyendo fenómenos degenerativos que provocan separaciones multifocales en las capas epiteliales, lo que conduce a una separación prematura de la unión materno-fetal (Stockhofe-Zurwieden *et al.*, 1993). Este fenómeno, unido a la vasculitis necrotizante observada en el cordón umbilical (Lager y Halbur, 1996), podría explicar la muerte de los fetos por un fenómeno de hipoxia. Por el contrario, en los fetos procedentes de abortos causados por el virus normalmente no se observa ninguna lesión. Sin embargo, esporádicamente se han descrito hemorragias extensas del pulmón con degeneración y necrosis bronquial (Lager y Ackerman, 1994) y la presencia de arteritis, miocarditis y encefalitis (Rossow *et al.*, 1996; Lager y Halbur, 1996).

1.6. RESPUESTA INMUNITARIA

Uno de los factores responsable de la falta de protección de las vacunas es que el VSRRP es capaz de alterar la respuesta inmune innata del hospedador (Albina *et al.*, 1998b; Buddaert *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2004a) y el desarrollo de la respuesta inmune específica está retardada.

Varios TLRs (del inglés “*Toll-like receptors*”) entre los que se incluyen TLR3, TLR7/8 y TLR9 están involucrados en la respuesta antiviral estimulando la producción de citoquinas como el interferon (IFN) de tipo 1 (Akira y Takeda, 2004). La información publicada acerca de estos receptores y su participación en la respuesta antiviral frente al VSRRP es escasa. Dado que los TLR3 reconocen la doble cadena de ARN y que este se acumula en la célula durante el ciclo de replicación en el caso de los Nidovirales (Perlman y Netland, 2009; Van Hemert *et al.*, 2008), es de esperar que estos receptores TLR3 interaccionen con el VSRRP. A pesar de que Chaung *et al.* (2010) describieron que tras la infección in vitro de MAPs o de células dendríticas inmaduras, se producía una inhibición transitoria de la expresión tanto de TLR3 como de TLR7, cuando la expresión de TLR3 fue observada in vivo/ ex vivo, los resultados indicaron lo contrario. Por ello, Sang *et al.* (2008) mostraron como los MAPs que procedían de lechones de dos semanas de edad e infectados de forma congénita poseían un aumento en la expresión de TLR3 y Liu *et al.* (2009) reportaron no sólo un aumento en la expresión de TLR3 sino también de TLR2, TLR4, TLR7 y TLR8 en los tejidos linfoides de los cerdos infectados. Por otra parte, Miguel *et al.* (2010) también observó este aumento en la expresión de TLR3, TLR4 y TLR7 en los linfonódulos traqueobronquiales y en algunas áreas del cerebro de cerdos infectados experimentalmente a las 8 semanas de edad, sugiriendo que la infección por este virus podría alterar también la respuesta inmune innata del cerebro. No obstante, los TLR3 parecen desempeñar un papel importante en el control de la replicación viral. Así, varios estudios señalan que la activación de estos receptores usando ARN de doble cadena químico o exógeno reduce la multiplicación del virus (Sang *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2009). De hecho, cuando en las células diana se redujo la expresión de estos receptores, la replicación del VSRRP aumentó (Sang *et al.*, 2008). Por el contrario, la activación de los TLR4 en los MAPs no influyó en la infección por VSRRP (Miller *et al.*, 2009). Recientemente, Calzada-Nova *et al.* (2010) sugirieron que el VSRRP no induce la secreción de determinadas citoquinas por parte de las células dendríticas plasmocitoides y de esta manera interfiere con los receptores TLR7 y TLR9.

En cuanto a la acción del VSRRP frente al interferón, hay que decir que a pesar de que estudios tempranos sugerían que la replicación de este virus en los MAPs podía ser controlada por el IFN α aunque los cerdos infectados producían bajos niveles de esta citoquina en el tracto respiratorio (Albina *et al.*, 1998a; Buddaert *et al.*, 1998; Bautista y Molitor, 1999), estudios más recientes han demostrado que el VSRRP inhibe la expresión de IFN de tipo 1 en las células MARC-145 (Miller *et al.*, 2004) y que este IFN α no interfiere en la internalización del virus (Loving *et al.*, 2007). El mecanismo por el cual el VSRRP es capaz de suprimir la producción de IFN de tipo 1 ha sido estudiado por numerosos grupos de investigación. Lee y Kleiboeker (2005) señalaron que el VSRRP es capaz de activar el factor nuclear Kappa Beta (NF-BK). Como se muestra en el estudio realizado por Luo *et al.* (2008), el VSRRP previene la expresión de IFN β por las células MARC-145 mediante la inactivación del promotor estimulador del IFN β 1 (IPS-1). Además, un estudio reciente muestra como las proteínas no estructurales del virus,

nsp1 β , nsp2, nsp4 y nsp11, son capaces de inhibir de manera notable la producción de IFN- α (Beura *et al.*, 2010). Así, la nsp1 α inhibe el factor regulador 3 (IRF3) que media la activación del promotor de IFN β y la nsp1 β inhibe la fosforilación del IRF3 y la traslocación nuclear (Beura *et al.*, 2010). Además, la nsp1 β es capaz de inhibir la traslocación nuclear del STAT1 y la vía de señalización JAK-STAT resultando en la inhibición en la síntesis de IFN y la señalización, mientras que la nsp1 α únicamente inhibe la síntesis de IFN (Chen *et al.*, 2010).

Además, el VSRRP es capaz de regular otras citoquinas. En estudios *in vitro* (Chiou *et al.*, 2000; López- Fuertes *et al.*, 2000) se vio que los MAPs infectados por el VSRRP aparentaban tener un deterioro de la capacidad de producción de TNF α . Esto coincide con los resultados obtenidos por Van Reeth *et al.* (1999) y Thanawongnuwech *et al.* (2001) al analizar los lavados broncoalveolares (BAL). En estos estudios el TNF α no se detectó significativamente en los BAL. Sin embargo, lo que sí se detectó en ambos estudios es la IL1, confirmándose en otros (Labarque *et al.*, 2003b; Van Gucht *et al.*, 2003). En contraste, estudios *in vitro* con MAPs (Ait-Ali *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2002) o células mononucleares de sangre periférica (PBMC) (Aasted *et al.*, 2002) o estudios *in vivo/ ex vivo* (Aasted *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2002; Miguel *et al.*, 2010; Van Gucht *et al.*, 2003) indicaron que el VSRRP induce la expresión de TNF α . La interpretación de estos resultados aparentemente contradictorios parece encontrarse en un estudio reciente llevado a cabo por Chen *et al.* (2010) según el cual los cambios y delecciones de la proteína no estructural del virus, nsp2, podría ser considerada la responsable de las diferencias en la expresión de TNF α .

Por otra parte, la mayoría de los estudios señalan que el VSRRP induce la expresión de IL8 (Aasted *et al.*, 2002; Thanawongnuwech *et al.*, 2001). Sin embargo, en cuanto a la IL6, existe cierta controversia, de manera que algunos autores indican su producción *in vivo/ ex vivo* (Liu *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2009; Van Gucht *et al.*, 2003) mientras que otros no lo hacen (Diaz *et al.*, 2005, 2006). Resultados conflictivos también se encuentran en la literatura acerca de la IL10. A pesar de que la mayoría de los estudios sugieren que esta citoquina desempeña un papel importante en la inmunopatogenia del VSRRP (Charerntantanakul *et al.*, 2006; Suradhat *et al.*, 2003; Suradhat y Thanawongnuwech, 2003; Genini *et al.*, 2008; Chang *et al.*, 2008) que indicaron que el VSRRP inducía la expresión de IL10, otros estudios (Thanawongnuwech *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007a) no detectaron una respuesta de IL10 significativa tras la infección *in vitro* con VSRRP. Esta gran variedad de resultados sugiere que la inducción de IL10 depende del aislado viral utilizado en los distintos experimentos (Diaz *et al.*, 2006; Silva-Campa *et al.*, 2009).

En relación a los efectos que tiene la infección por el VSRRP sobre las células presentadoras de antígeno (CPA) no se conocen del todo, pero algunos autores señalan que el VSRRP replica en las células dendríticas provocando una disminución de la expresión del CMH-I (Wang *et al.*, 2007a; Chang *et al.*, 2008) y del CMH-II (Wang *et al.*, 2007a; Flores- Mendoza *et al.*, 2008).

Por tanto, parece que el VSRRP podría reducir la respuesta inmune innata alterando la producción de citoquinas por parte de los macrófagos y las células dendríticas, así como modificando la expresión de moléculas involucradas en la presentación de antígeno y esto contribuye, probablemente, al retraso en la aparición de la respuesta inmune específica tanto de base humoral como celular y también a la persistencia del virus (Kimman *et al.*, 2009).

Los estudios acerca de la respuesta adaptativa frente al VSRRP se han focalizado en el desarrollo de anticuerpos neutralizantes (AN) y en la inmunidad mediada por células y han demostrado que, tanto la respuesta humoral como esta última frente al virus, están retardadas.

1.6.1. RESPUESTA INMUNE HUMORAL

En infecciones experimentales, los anticuerpos frente al VSRRP pueden detectarse en algunos casos a partir de los 5 días p.i. y con frecuencia, a finales de la segunda semana p.i. todos los animales desafiados seroconvierten (Díaz *et al.*, 2005; Meier *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 1992, 1995). Inicialmente, aparecen y predominan las IgMs para, posteriormente, y sobre el día 21 p.i. comiencen a predominar las IgGs (Yoon *et al.*, 1994; Vezina *et al.*, 1996; Loemba *et al.*, 1996).

Los primeros estudios sobre la respuesta humoral frente al VSRRP (Nelson *et al.*, 1994) mostraron que los anticuerpos más tempranos se dirigían frente a la proteína de la nucleocápside y los anticuerpos frente a las proteínas M y GP5 se desarrollaban más tarde. Otros estudios señalaron que la respuesta temprana también incluía anticuerpos que se dirigían frente a los epítomos situados en las nsp del virus, particularmente hacia la nsp2 (De Lima *et al.*, 2006; Oleksiewicz *et al.*, 2001) pero también hacia la nsp1 (Johnson *et al.*, 2007). Los títulos de anticuerpos dirigidos frente a estas dos proteínas no estructurales del virus eran similares o incluso mayores que aquellos dirigidos frente a la proteína N (Johnson *et al.*, 2007) y carecían de capacidad neutralizante (Yoon *et al.*, 1994). Yoon *et al.* (1996, 1997) sugirieron que estos anticuerpos no neutralizantes podían ser los responsables de un fenómeno conocido como potenciamiento dependiente de anticuerpos (ADE) de la replicación viral. Este fenómeno ha sido descrito como una internalización del virus en los macrófagos potenciada como resultado de la opsonización por anticuerpos no neutralizantes y, de acuerdo a distintos estudios (Cancel-Tirado *et al.*, 2004; Welch *et al.*, 2004; Yoon *et al.*, 1996) los epítomos responsables de inducir anticuerpos que participan en el ADE podrían localizarse en las proteínas N y GP5.

Los anticuerpos neutralizantes aparecen alrededor de la tercera o cuarta semana p.i. o incluso más tarde, siendo raro detectarlos antes (Díaz *et al.*, 2005; Loemba *et al.*, 1996; Meier *et al.*, 2003; Takikawa *et al.*, 1996; Kimman *et al.*, 2009; Murtaugh *et al.*, 2002) y los títulos son con frecuencia muy bajos (Díaz *et al.*, 2005; Loemba *et al.*, 1996; Meier *et al.*, 2003) variando en función de la cepa con la que los cerdos han sido inoculados (Plagemann, 2006). Estos anticuerpos neutralizantes parecen estar inducidos por distintas proteínas del virus, incluyendo la GP3 (Cancel-Tirado *et al.*, 2004; Kim y Yoon, 2008), la GP4 (Costers *et al.*, 2010; Kwang *et al.*, 1999; Meulenberg *et al.*, 1997; Weiland *et al.*, 1999), la GP5 (Pirzadeh y Dea, 1997; Cancel-Tirado *et al.*, 2004; Gonin *et al.*, 1999; Kim y Yoon, 2008; Plagemann, 2004a, b; Weiland *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000) y M (Cancel-Tirado *et al.*, 2004; Kim y Yoon, 2008), siendo lo más aceptado que la GP5 contenga el principal epítomo neutralizante del virus (NE) (Ostrowski *et al.*, 2002; Plagemann, 2004a, b) aunque, realmente, no se conoce cuáles son los más relevantes en términos de protección, e incluso se ha cuestionado la existencia de epítomos neutralizantes en la GP4 de los aislados de genotipo 2 (Vanhee *et al.*, 2010) y en la GP5 de aislados genotipo 1 (Vanhee *et al.*, 2011).

El papel que desempeñan estos AN frente al VSRRP consiste en bloquear la infección previniendo la interacción del virus con la sialoadhesina de los macrófagos (Delputte *et al.*, 2004b, 2005; Vanderheijden *et al.*, 2003; Van Gorp *et al.*, 2008).

Muchas hipótesis se han postulado para explicar el retraso en el desarrollo de los AN y los bajos títulos de los mismos. Por ejemplo, una menor estimulación de citoquinas o las variaciones en la expresión de moléculas relacionadas con la presentación de antígeno podría predisponer a una baja respuesta de AN frente al VSRRP (Chang *et al.*, 2008; Flores- Mendoza *et al.*, 2008). Sin embargo, las hipótesis más aceptadas se basan en la existencia de un epítipo de distracción (Ostrowski *et al.*, 2002) en la proteína GP5 localizado cerca del epítipo neutralizante de esta proteína y que desviaría la respuesta inmune y en la glicosilación del ectodominio de la GP5 que influye negativamente en la inmunogenicidad del NE y, por tanto, en la susceptibilidad a la neutralización (Ansari *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2007a).

1.6.2. RESPUESTA INMUNE CELULAR

Numerosos estudios han utilizado la evaluación de la linfoproliferación para analizar el desarrollo de la respuesta inmune celular frente al VSRRP (Bautista y Molitor, 1997; López-Fuertes *et al.*, 1999). En estos estudios, el comienzo de la respuesta proliferativa se detectó a las 4 semanas p.i. y se dirigió, principalmente, frente a las proteínas GP5, M y N, siendo la proteína M el inductor más potente (Bautista y Molitor, 1997) y siendo también capaces de inducirla las proteínas GP2 (Bautista y Molitor, 1997) y GP3 (Bautista y Molitor, 1997; Jiang *et al.*, 2007b) pero de manera más débil.

Por otra parte varios estudios mostraron que las células secretoras de IFN γ específico frente al VSRRP no se desarrollaban antes de las 2- 3 semanas p.i.. Sin embargo, la frecuencia de estas células en cultivos de PBMC mostró un comportamiento errático durante varias semanas p.i. (Diaz *et al.*, 2005; Meier *et al.*, 2003) incrementándose lentamente hasta alcanzar un nivel estable varios meses más tarde (Meier *et al.*, 2003; Diaz *et al.*, 2005, 2006; Royae *et al.*, 2004).

Kwang *et al.* (1999) examinaron la respuesta a varias proteínas virales, indicando que las proteínas N, M, GP5 y GP4 inducen una respuesta inmune celular. Más tarde, Vashisht *et al.* (2008) identificaron dos epítopos en GP5 que inducen IFN γ y Diaz *et al.* (2009) otros epítopos inductores de IFN γ en N, GP4 y GP5. Jeong *et al.* (2010), por su parte, encontraron una repuesta IFN γ significativamente mayor frente a la proteína M que frente a la N. Se puede concluir, por tanto, que entre las proteínas estructurales del virus, M y N seguidos de GP4 son los inductores de la respuesta IFN γ más potentes (Darwich *et al.*, 2010).

La evaluación de las poblaciones de células involucradas en la respuesta IFN γ indica que esta citoquina fue producida predominantemente por las células T CD4 $^{+}$ / CD8 $^{+}$ y en menor medida por las células CD4 $^{-}$ / CD8 $\alpha\beta^{+}$ (Meier *et al.*, 2003). Además, se sabe que existe controversia con respecto al papel que juega cada población celular en la repuesta inmune celular. Lamontagne *et al.* (2003) reportaron que la presencia de células CD3 $^{+}$ CD8 en los órganos linfoides estaba relacionado con la persistencia del virus en tejidos. Otros autores (Albina *et al.*, 1998b; Diaz *et al.*, 2005; Samsom *et al.*, 2000; Shimizu *et al.*, 1996) señalan que la proporción de células CD8 $^{+}$

aumenta en sangre y tejidos en las primeras semanas p.i.. Sin embargo, parece que la proliferación de células CD8+ corresponde a la respuesta a estímulos inmunológicos menos específicos y no a una respuesta específica a los antígenos virales (Albina *et al.*, 1998b; Shimizu *et al.*, 1996). Recientemente, Costers *et al.* (2009) mostraron que los niveles de células CD3+CD8 aumentan en sangre a partir de la infección por VSRRP pero también señalan que estas células CD8 no muestran actividad citotóxica. Esto podría atribuirse, entre otras causas, a algún tipo de defecto en el reconocimiento de los MAPs infectados, a algún bloqueo de los mecanismos citotóxicos frente a los macrófagos o al hecho de que las células CD8 detectadas no sean específicas del virus.

Las características frecuentes de la infección por VSRRP y el hecho de que en cerdos muy jóvenes la infección pueda ser persistente han sido considerados evidencias indirectas del desarrollo de células T reguladoras (Tregs). El papel de estos Tregs no está de todo claro pero parece ser que están involucrados en la supresión de la activación del sistema inmune ya que producen IL10 o TGF β y tras la estimulación con un antígeno conocido son capaces de disminuir o incluso inhibir la proliferación o la capacidad efectora de otras células T (Käser *et al.*, 2008).

1.7. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico clínico del VSRRP es complicado de realizar debido al amplio rango de síntomas que pueden observarse en una población en función de la edad y estado fisiológico de los cerdos afectados, la inmunidad previa que presenten, la virulencia del aislado que causa el brote y la implicación de agentes secundarios. Todos estos factores hacen que sea muy difícil establecer una sospecha clínica que oriente el diagnóstico, especialmente en el caso de que la infección se produzca en animales en crecimiento en los cuales los signos clínicos observados son especialmente variados y condicionados por la presencia de otros agentes patógenos. Asimismo, el diagnóstico anatómopatológico carece de valor debido a que la infección no produce lesiones patognomónicas.

Por lo tanto, para realizar un diagnóstico definitivo es necesario combinar la sospecha clínica, basada en los síntomas observados y las alteraciones de los parámetros productivos, con la detección del agente causal o, en el caso de animales negativos, de anticuerpos específicos frente al mismo.

1.7.1. DETECCIÓN DEL VIRUS

La detección del agente causal se puede llevar a cabo utilizando distintas técnicas. La primera de ellas es el aislamiento vírico. Sin embargo, a pesar de ser la técnica de elección para confirmar la presencia del virus (Mengeling y Lager, 2000), no se utiliza de forma rutinaria debido a las dificultades que entraña su cultivo *in vitro*. Esto se debe a que muchos aislados del virus, sobre todo los de genotipo 1, sólo se replican en cultivos primarios de MAPs, que deben obtenerse de lavados pulmonares realizados a lechones de menos de 6 semanas de vida. Además, al ser los MAPs una población heterogénea, la permisibilidad de los distintos lotes a la

infección por el virus es muy variable, lo cual complica aún más el aislamiento del VSRRP. Finalmente, aunque se ha descrito que ciertas líneas celulares estables derivadas de la línea MA-104, procedente de riñón de mono, son permisivas al virus (Collins *et al.*, 1992), y de hecho se han utilizado rutinariamente para el aislamiento de virus de genotipo 2, recientemente se ha determinado que la sensibilidad de estas líneas celulares es mucho menor que la de los MAPs (De Abin *et al.*, 2009).

Otra posibilidad es detectar la presencia de antígenos del virus en muestras de tejidos. Para ello se han desarrollado técnicas como la inmunofluorescencia directa (IFD) en cortes de tejido utilizando anticuerpos monoclonales conjugados con fluoresceína (Benfield *et al.*, 1992b; Nelson *et al.*, 1992), la inmunoperoxidasa en tejidos fijados con formalina o solución de Bouin (Halbur *et al.*, 1994) y la inmunohistoquímica (Magar *et al.*, 1993). Todas ellas tienen la ventaja de ser más rápidas que el aislamiento vírico y de no necesitar la infraestructura necesaria para realizar cultivos celulares. Además, ofrecen la ventaja de permitir evaluar a la vez la presencia de antígenos víricos y las lesiones histológicas, además de permitir la realización de estudios retrospectivos utilizando tejidos fijados con formalina y embebidos en parafina (Larochelle *et al.*, 1994). Sin embargo, la sensibilidad de estas técnicas es mucho menor que la del aislamiento vírico (Martínez-Lobo *et al.*, 2011b), lo cual limita su utilización.

Finalmente, la detección del virus en muestras de tejidos se puede llevar a cabo utilizando técnicas de hibridación *in situ* que permite la detección del ácido nucleico del virus y la localización del mismo en las células infectadas (Larochelle *et al.*, 1996; Park *et al.*, 1996b). Además, esta técnica tiene la ventaja de tener una sensibilidad mayor que la inmunohistoquímica.

Debido a las dificultades que tiene el aislamiento vírico y la baja sensibilidad de la detección de antígeno o ácido nucleico del virus en muestras de tejido, la técnica más utilizada para la detección del VSRRP es la transcripción inversa (RT, del inglés *Reverse Transcription*) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*). Entre las ventajas de esta técnica se encuentran su alta sensibilidad, sobre todo si se diseñan técnicas de PCR anidadas en las que se realiza una segunda PCR utilizando como molde el producto de la primera (Christopher-Henning *et al.*, 1995b; Wagstrom *et al.*, 2000) y la posibilidad de utilizarlas para la detección de virus en muestras que pueden ser tóxicas para los cultivos celulares, como las muestras de semen (Christopher-Henning *et al.*, 1995b), las muestras de heces o las muestras procedentes de tejidos autolíticos en los cuales el virus se inactiva muy fácilmente (Benson *et al.*, 2002). Además, al igual que sucede con la hibridación *in situ*, esta técnica permite la diferenciación de genotipos a través de un diseño adecuado de los oligonucleótidos empleados como cebadores (Oleksiewicz *et al.*, 1998; Spagnuolo-Weaver *et al.*, 1998). Todo ello hace que la RT-PCR se considere una técnica muy sensible y específica (Benson *et al.*, 2002; Horter *et al.*, 2002). Estas características, unidas a la rapidez con que se puede realizar, hacen que se haya convertido en la técnica de elección en muchos laboratorios.

Además, el producto de RT-PCR se puede utilizar para caracterizar las cepas víricas encontradas en función del patrón de corte que obtengamos con determinados enzimas de restricción en la técnica conocida como RFLP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*), basada en la diferencia en la secuencia de bases de determinadas zonas del genoma entre distintas cepas. Esta diferencia hace que existan distintas dianas para una serie

de enzimas de restricción específicos en distintas cepas. El corte con dichas enzimas permite la obtención de patrones diferentes dependiendo del número de puntos de corte que tenga para cada uno de ellos en la secuencia estudiada. Una de las principales utilidades de esta técnica es la diferenciación entre cepas de campo y cepas vacunales (Wesley *et al.*, 1998). Además de la técnica de RFLP, se puede realizar la secuenciación del fragmento amplificado por RT-PCR lo cual permite su comparación con otras secuencias disponibles. Con este sistema es posible diferenciar cepas vacunales de cepas de campo, establecer relaciones filogenéticas entre cepas, así como monitorizar la evolución del virus en una población, tanto en el tiempo como entre grupos de animales (Andreyev *et al.*, 1997; Rowland *et al.*, 1999; Meng, 2000; Dee *et al.*, 2001; Key *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2002).

1.7.2. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE AL VIRUS

La detección de anticuerpos específicos frente al virus tiene valor diagnóstico en primoinfecciones ya que la seroconversión indica exposición al virus. Por el contrario, en animales positivos, la reexposición al virus no conduce necesariamente a un aumento en la cantidad de anticuerpos por lo que el diagnóstico no se puede basar en la respuesta anamnésica o secundaria. No obstante, dado que la detección de anticuerpos es fácil de realizar y útil en estudios epidemiológicos, para determinar en qué momento circula el virus en los animales en crecimiento, existe una amplia variedad de técnicas disponibles que se utilizan tanto con fines diagnósticos como experimentales.

La primera técnica que se desarrolló fue la técnica de la inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA, del inglés *Immunoperoxidase Monolayer Assay*) que fue desarrollada en Lelystad y ampliamente utilizada en toda Europa. Esta técnica se basa en la detección de anticuerpos específicos unidos a MAPs, u otras células permisivas, previamente infectados con el VSRRP (Wensvoort *et al.* 1991, 1992). Mediante esta técnica aparecen títulos significativos de anticuerpos a los 6 días p.i. alcanzando un pico a las 5 ó 6 semanas p.i.. La duración de los mismos puede ser de 1 año aproximadamente, aunque algunos animales son negativos a los 4-6 meses de la infección. Aunque la especificidad de la técnica es muy buena, la variabilidad antigénica puede tener repercusiones importantes en los resultados obtenidos (Wensvoort *et al.*, 1992).

Con la misma frecuencia con que se ha utilizado la técnica de IPMA en Europa ha sido utilizada la inmunofluorescencia indirecta (IFI) en Los Estados Unidos de América. Fue adaptada por Yoon *et al.* (1992) y tiene una sensibilidad y una especificidad similares a las de la técnica de IPMA. Con el tiempo se ha desarrollado también una técnica de IFI que detecta anticuerpos del tipo IgM, haciendo posible la detección de animales en fase aguda de la enfermedad (Park *et al.*, 1995). Estos anticuerpos se pueden detectar a partir del día 5 p.i. y hasta los días 28 a 63 p.i. según distintos autores (Park *et al.*, 1995; Loemba *et al.*, 1996; Vézina *et al.*, 1996). Los principales inconvenientes de la técnica de IFI son la subjetividad de la interpretación de los resultados, que puede conducir a grandes diferencias en los resultados emitidos por distintos laboratorios, y la influencia de la variabilidad antigénica en los resultados obtenidos.

Los problemas que presenta la variabilidad antigénica para las técnicas anteriormente mencionadas se han resuelto en gran medida con el desarrollo de distintos tipos de

inmunoensayos enzimáticos (ELISAs, del inglés *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) que están disponibles en el mercado en distintos países y se basan en la utilización de virus purificados para tapizar las placas o de proteínas recombinantes expresadas en distintos sistemas. Esta variabilidad en las técnicas utilizadas por distintas casas comerciales hace que existan diferencias importantes en la sensibilidad y especificidad de los distintos kits disponibles en el mercado (Mateu *et al.*, 2006; Diaz *et al.*, 2012; Venteo *et al.*, 2012). Asimismo, al igual que sucede con la IFI, existen kits que detectan IgMs por lo que pueden ser utilizados para diagnosticar infecciones agudas.

Por otra parte hay que tener en cuenta que, los ELISAs no son adecuados para la detección cuantitativa de anticuerpos ya que el valor de S/P ratio que se obtiene en estos ensayos no se correlaciona con las concentraciones relativas de anticuerpos (Mengeling y Lager, 2000).

Por último, entre las técnicas de diagnóstico serológico se ha desarrollado la técnica de seroneutralización. Sin embargo, se trata de una técnica poco sensible ya que los anticuerpos neutralizantes son de aparición tardía (Frey *et al.*, 1992; Nelson *et al.*, 1994) y, en su mayoría, específicos de cepa, por lo que su reactividad cruzada es muy limitada (Martínez-Lobo *et al.*, 2011b). Estos hechos limitan mucho su utilidad práctica, quedando su uso prácticamente restringido a estudios experimentales.

Sea cual sea la técnica de diagnóstico que se utilice, y teniendo en cuenta la gran extensión que presenta hoy en día la enfermedad, hay que tener presente que una toma de sangre no es suficiente para determinar si la infección es reciente o no y que la serología se debe utilizar en poblaciones y no para hacer un diagnóstico clínico individual.

Por otra parte, es también importante conocer la dinámica de los anticuerpos en los animales infectados. Así, se ha determinado que, en cerdos expuestos al virus bajo condiciones experimentales, se desarrollan anticuerpos específicos detectables por las distintas técnicas entre los días 5 y 9 p.i. para IFI, 9 y 11 p.i. para IPMA, 9 y 13 p.i. para ELISA y 9 y 28 para seroneutralización. La duración de los anticuerpos también es variable dependiendo de la técnica considerada. El pico máximo de anticuerpos se alcanza entre 30 y 50 días p.i. para IFI, IPMA y ELISA y entre 60 y 90 días p.i. para seroneutralización (Yoon *et al.*, 1995) y a partir de este momento empiezan a disminuir hasta ser indetectables entre 4 y 5 meses p.i. para IFI, 4-10 meses para ELISA, 11-12 meses para IPMA y 12 para seroneutralización. Cuando detectamos anticuerpos del tipo IgM mediante IFI, éstos aparecen en torno al día 5 p.i. y son detectables durante un periodo de hasta 28 días (Park *et al.*, 1995).

1.8. PREVENCIÓN Y CONTROL

A lo largo del tiempo se han desarrollado numerosas medidas de control y prevención frente al SRRP, debido a su impacto en la industria porcina a nivel mundial. No obstante, a pesar de haber progresado en el entendimiento de las rutas de transmisión del VSRRP y en las medidas de bioseguridad más efectivas para prevenir la infección por VSRRP en las granjas de cerdos, es imprescindible ampliar, aún más, estas medidas de control tanto en la granja como a nivel regional (Corzo *et al.*, 2010).

El primer objetivo para controlar el VSRRP en las granjas, es conseguir lechones, en el momento del destete, negativos a VSRRP (no infectados) y, con este fin, se han puesto en marcha numerosas estrategias. Dado que una de las rutas de transmisión del VSRRP es a través del semen (Robertson y Thrusfield, 1992; Yaeger *et al.*, 1993), hoy en día, se analiza el semen para evitar la entrada del mismo contaminado en las granjas de cría (Corzo *et al.*, 2010). Además, en el año 2000, McCaw introdujo un nuevo concepto, McRebel (del inglés *"Management Changes to Reduce Exposure to Bacteria to Eliminate Losses"*) con el fin de controlar la diseminación de distintos agentes patógenos en lechones. Polson *et al.* (2010) destacaron la importancia de estas prácticas englobadas bajo el término McRebel al observar que en granjas de cría sometidas a la eliminación del VSRRP y en las que no se llevaban a cabo dichas prácticas de manera continua existía una recirculación recurrente del virus en la población de lechones. Por otra parte, la introducción de cerdas jóvenes se ha convertido en uno de los factores más importantes para el control del VSRRP dado que son susceptibles a la infección por el virus si, previo a la introducción en la granja, no han desarrollado inmunidad protectora. Además, van a influir con la producción de lechones negativos a VSRRP tras el destete. De manera que si estas cerdas se infectan durante el periodo de cría se convertirán en una fuente de virus para la granja transmitiéndoselo a los lechones, pero si por el contrario, son infectados durante su fase de crecimiento, se consiguen animales de cría que una vez introducidos en la granja podrían presentar, al menos, una inmunidad parcial frente a la reinfección (Dee *et al.*, 1995). En este sentido, el objetivo sería exponer a las cerdas a la misma cepa del virus que circula en la granja a la que se destinaran y a una edad suficientemente temprana para que se recuperen completamente antes de ser introducidas en dicha granja (Corzo *et al.*, 2010). Para alcanzar este objetivo han sido descritos distintos métodos como el contacto directo con cerdos virémicos, la inyección del virus vivo o la vacunación de las cerdas jóvenes durante el periodo de aclimatación antes de su introducción a la granja de cría (Corzo *et al.*, 2010).

Por otra parte, también se han descrito distintos métodos para la eliminación del VSRRP de granjas de cerdos entre los que se incluyen: realizar un examen serológico de la granja de cría y sacrificar aquellos animales seropositivos (Dee y Molitor, 1998; Dee *et al.*, 2001, 2003); eliminar todos los cerdos, desinfectar las instalaciones y volver a repoblar con animales negativos a VSRRP; o interrumpir la introducción de cerdas de reemplazo en la granja de cría durante un periodo aproximado de 6 meses junto con la eliminación de los animales seropositivos (Torremorell *et al.*, 2003). Este último, es el método más extendido y menos costoso para la eliminación del VSRRP (Yeske, 2010). Además, la exposición premeditada (Batista *et al.*, 2002) de la granja de cría con una cepa homóloga del virus o una vacuna viva modificada (MLV) como último paso antes de detener la introducción de los últimos animales

de reemplazo, aumenta la inmunidad colectiva cuando se inicia el cierre. El objetivo de exponer a todos los animales de cría a la vez es asegurarse de que todas las cerdas han tenido la oportunidad de desarrollar inmunidad frente al virus (Dee, 1996; Dee *et al.*, 1996a). De esta manera, a pesar de la existencia de animales persistentemente infectados, si no existen animales susceptibles en la granja, la capacidad del virus para circular dentro de la misma se verá significativamente reducida o, incluso, eliminada. Las introducciones futuras deberán llevarse a cabo con cerdas VSRRP negativas con el fin de mantener el rebaño libre de virus.

Para determinadas enfermedades animales, la eliminación regional del agente patógeno ha sido la única forma efectiva de control de la enfermedad. En este sentido, recientemente, Chile reportó la eliminación exitosa del VSRRP del país (Torremorell *et al.*, 2008) tras observar la presencia de granjas infectadas a través de un programa nacional de vigilancia en el año 2000. Esto se consiguió tras la cooperación coordinada de las autoridades gubernamentales, la industria local y los veterinarios y mediante la combinación de medidas de despoblación/repoblación y cierre de granjas. Así, en el año 2007 no se detectó ninguna muestra positiva mediante el programa de vigilancia.

Esto ha supuesto que, actualmente, exista controversia acerca de qué es mejor a largo plazo, si erradicar el virus o vacunar frente a él. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados, a día de hoy todavía no se ha conseguido desarrollar vacunas adecuadas para el control de la enfermedad y, aunque existen diversas vacunas en el mercado, ninguna de ellas parece ser la solución definitiva. Esto se debe a una serie de características inherentes al VSRRP que dificultan considerablemente esta tarea. La primera característica reseñable es la elevada variabilidad que presenta el virus. Esta variabilidad, especialmente en lo que se refiere a la antigenicidad, parece ser responsable de la falta de protección cruzada que se observa entre cepas. Este hecho ha sido demostrado en muchos estudios experimentales de protección que muestran como después de una infección natural los cerdos desarrollan una respuesta inmune homóloga eficaz en la prevención de la reinfección por la misma cepa (Lager *et al.*, 1997a, b; Lager *et al.*, 1999; Mengeling *et al.*, 2003a) que aparece dentro de los 60 días siguientes a la inoculación y que dura al menos 600 días (Lager *et al.*, 1997b). Sin embargo, cuando los cerdos con inmunidad natural se exponen a cepas heterólogas, la protección no es tan sólida y completa (Lager *et al.*, 1999; Mengeling *et al.*, 1999b).

Este fenómeno hace improbable que vacunas basadas en una sola cepa del virus sean capaces de proteger eficazmente frente a un desafío heterólogo, especialmente con cepas distantes antigénicamente. Es más, se ha postulado que el grado de eficacia de una vacuna dependerá en gran medida del grado de similitud existente entre la cepa vacunal y la cepa de desafío (Meng, 2000).

Los estudios experimentales llevados a cabo parecen confirmar que actualmente las vacunas disponibles muestran una eficacia razonable, tanto en cerdos adultos como en cerdos en crecimiento cuando el desafío se lleva a cabo con la cepa parenteral de la vacuna, es decir, cuando se trata de un desafío homólogo (Hesse *et al.*, 1996a; Gorcyca *et al.*, 1997a; Lager *et al.*, 1999).

Por el contrario, cuando el desafío es llevado a cabo con una cepa heteróloga, la protección es, en el mejor de los casos, parcial. En este sentido, la falta de protección es muy acusada cuando los animales inmunizados con vacunas del genotipo europeo o americano son expuestos a cepas de campo pertenecientes al genotipo contrario en el desafío. En estos casos, en cerdos en crecimiento y siendo optimistas, sólo se observa una reducción parcial de la viremia (Van Woensel *et al.*, 1998; Labarque *et al.*, 2000b, 2003a), mientras que en las cerdas adultas los estudios disponibles indican que la inmunidad conferida por la vacunación no es suficiente para prevenir la infección transplacentaria (Hesse *et al.*, 1997; Gorcyca *et al.*, 1997a).

Además, la falta de protección frente al desafío heterólogo se observa también cuando el virus de desafío es del mismo genotipo que la cepa vacunal. En este sentido, cuando cerdos en crecimiento han sido vacunados con una vacuna del genotipo europeo del subgrupo Lelystad y han sido expuestos, posteriormente, a una cepa de campo del subgrupo Italian, solo desarrollan una protección parcial que se traduce en una reducción de la viremia y de la presencia del virus WT (del inglés “*wild type*”) en el lavado pulmonar (Labarque *et al.*, 2004). Un efecto similar se ha observado en cerdas tras la inmunización con dos vacunas atenuadas españolas antes del parto que no fueron capaces de conferir una inmunidad completa originando una infección transplacentaria tras el desafío con una cepa del subgrupo Italian en el día 90 de gestación (Scotti *et al.*, 2006b).

Por otra parte, la falta de protección también se observa cuando la cepa utilizada en el desafío está muy próxima, desde el punto de vista genómico, a la cepa vacunal. Prieto *et al.* (2008) demostraron que incluso cuando la cepa de desafío pertenece al mismo subgrupo que la cepa vacunal y la homología genómica es elevada, no se logra una protección completa. Estos resultados concuerdan con otros estudios recientes que indican que la homología genómica entre la cepa vacunal y la de desafío no está necesariamente correlacionada con la protección esperada (Díaz *et al.*, 2006; Zuckermann *et al.*, 2007).

La segunda característica del virus que dificulta el desarrollo de vacunas eficaces es la baja inmunogenicidad del VSRRP. Así, se ha descrito que el virus es capaz de inhibir la respuesta de interferones de tipo I (Van Reeth *et al.*, 1999; Beura *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010), cuya función es indispensable para el desarrollo de una respuesta adaptativa sólida. Asimismo, se sabe que la respuesta de células secretoras de IFN γ es débil y errática en los primeros momentos tras la infección e, incluso cuando se desarrolla una respuesta específica clara, la frecuencia de células secretoras de IFN γ es muy inferior a la encontrada en respuesta a la infección por otros virus que afectan al cerdo (Meier *et al.*, 2003). Igualmente, la respuesta de anticuerpos neutralizantes obtenida tras la infección tiende a retrasarse, obteniéndose un título máximo de anticuerpos neutralizantes relativamente bajo (Yoon *et al.*, 1994; López y Osorio, 2004).

A pesar de estas limitaciones, distintas vacunas han sido desarrolladas y lanzadas al mercado por diversas empresas farmacéuticas.

En la actualidad, han comenzado a desarrollarse vacunas de nueva generación.

Gracias al conocimiento de los mecanismos moleculares que utiliza el virus para llevar a cabo su ciclo replicativo dentro de las células a las que infecta, se han localizado las zonas del

genoma del VSRRP directamente implicados en la expresión de proteínas clave en los distintos procesos infectivos del virus. Basándose en esto, se han desarrollado vacunas de subunidades que permiten la expresión de proteínas estructurales del VSRRP a partir de clonar los genes codificantes de estas en distintos sistemas como baculovirus recombinantes (Kreutz *et al.*, 1997; Plana-Duran *et al.*, 1997a) o sistemas procariotas (Pirzadeh y Dea, 1998; Fernández *et al.*, 2003). Sin embargo, aunque en el primer caso existe controversia acerca de la protección conferida por las mismas, en el segundo caso se determinó su fracaso a la hora de producir una respuesta inmune capaz de proteger animales vacunados frente a un desafío con una cepa virulenta del VSRRP. Además, Prieto *et al.* (2010) observaron una exacerbación de la enfermedad en cerdos desafiados con una cepa virulenta del VSRRP tras su inmunización previa con una de estas vacunas.

Por otra parte y a partir de estudios realizados por Pirzadeh y Dea (1998) que testaron el valor vacunal de un plásmido capaz de expresar la proteína GP5 bajo la acción del promotor del citomegalovirus humano, se desarrollaron las vacunas de ADN frente al VSRRP. A partir de esta, se desarrollaron distintos plásmidos con distintas combinaciones de ORFs (Kwang *et al.*, 1999; Barfoed *et al.*, 2004) confirmándose la capacidad de las proteínas GP5 (Pirzadeh y Dea, 1998; Kwang *et al.*, 1999; Barfoed *et al.*, 2004) y GP4 (Kwang *et al.*, 1999) en la inducción de anticuerpos neutralizantes y descartándose en las proteínas N y M (Kwang *et al.*, 1999). Estudios similares se desarrollaron utilizando vacunas ADN con las ORFs 5 y 7 del VSRRP clonados junto con el ADNc de las citoquinas IFN γ e IL2 (Xue *et al.*, 2004), con plásmidos capaces de expresar simultáneamente las ORFs 5 y 6 del VSRRP (Jiang *et al.*, 2006) o con la utilización de bacterias tales como *S. typhimurium* como portadoras de vacunas de ADN administradas por vía oral (Jiang *et al.*, 2004) con el fin de lograr una mayor respuesta inmune tanto a nivel sistémico como a nivel de mucosas. Sin embargo, aunque las vacunas de ADN se habían convertido en una respuesta esperanzadora por su facilidad de construcción y su amplia estabilidad, parece que, en el mejor de los casos, sólo son efectivas parcialmente primando la producción de anticuerpos frente al VSRRP y de ciertas citoquinas implicadas en la respuesta inmune de base celular frente al VSRRP. Además, en ningún caso han demostrado eliminar la viremia ni la distribución orgánica del virus tras un desafío con el VSRRP por lo que, hoy por hoy, están lejos de convertirse en la solución real al problema del SRRP.

Como alternativa a estas dos anteriores, vacunas de subunidades y vacunas de ADN, se están aplicando diferentes técnicas de ingeniería genética para generar microorganismos recombinantes capaces de expresar proteínas del VSRRP con importancia inmunológica. Mediante la replicación en el organismo hospedador de dichos microorganismos recombinantes se asegura una mayor expresión de las proteínas del VSRRP, posibilitando así una mayor respuesta inmune frente al virus. También, la utilización de estos microorganismos como vectores de expresión de proteínas exógenas abre las puertas a la creación de vacunas bivalentes o multivalentes capaces de proporcionar protección frente a más de un agente infeccioso. Dentro de este campo, se ha evaluado la utilización de *Mycobacterium bovis* como vector de expresión de la proteína GP5 truncada y M del VSRRP (Bastos *et al.*, 2004), poxvirus de la gallina recombinante capaz de expresar las proteínas GP3 y GP5 del VSRRP junto con la IL18 porcina (Shen *et al.*, 2007; Yoshihiro *et al.*, 2003) o el virus Ankara de la vacuna modificada (rMVA) como vector para la expresión de distintas combinaciones de las proteínas

mayoritarias de la envoltura del VSRRP (Zheng *et al.*, 2007a, b). Sin embargo, en los dos primeros casos, a pesar de observarse una mejora en la viremia y en la distribución orgánica del virus con respecto a los controles no vacunados, no fueron capaces de inducir una protección completa (Bastos *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2007) y en el último caso, no se pudo evaluar realmente la eficacia de esta construcción, ya que no se testó en cerdos (Zheng *et al.*, 2007a, b).

Un problema evidente de las vacunas vivas recombinantes de nueva generación es que el vector vacunal utilizado puede replicarse independientemente dentro del organismo vacunado y por tanto puede acabar transmitiéndose a otros animales en contacto con los vacunados o al ambiente. Este importante problema de seguridad fue superado gracias a la generación de virus defectivos en la replicación que impiden su diseminación. En este sentido, uno de los vectores más estudiados y utilizados en el desarrollo de vacunas frente al SRRP han sido los vectores basados en adenovirus no replicativos. Así, Gagnon *et al.* (2003) desarrollaron dos adenovirus humanos de tipo 5 con las ORF5 y 6 del VSRRP insertadas en su genoma y tras la inmunización de lechones con estas partículas víricas se observó que no eran capaces de generar una respuesta inmune protectora. Análogamente, se clonaron en este mismo vector un bloque capaz de coexpresar las proteínas GP3 y GP5 más una proteína de choque térmico, HSP70, procedente de *Haemophilus parasuis* (Li *et al.*, 2009) y, en otro caso, más un factor estimulante de colonias de la línea granulocito-macrófago (GM-CSF) (Wang *et al.*, 2009) observándose, en ambos casos, un incremento significativo de la respuesta inmune comparándola con la observada con el vector que expresa únicamente GP3 y GP5 (Li *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009). También se planteó la utilización del virus de la gastroenteritis transmisible (VGET) como vector de expresión de las proteínas GP3, GP4 y GP5 (Plana-Duran *et al.*, 2000) pero la evaluación del grado de protección de la vacuna sólo se llevó a cabo mediante la observación de las temperaturas rectales y la ganancia de peso tras el desafío en animales vacunados y desafiados. Otra alternativa fue el uso de un baculovirus modificado capaz de coexpresar las proteínas GP5 y M del VSRRP bajo la acción de 2 promotores del citomegalovirus humano, obteniéndose una estimulación de anticuerpos neutralizantes mayor cuando el desafío se llevó a cabo frente a una cepa homóloga (Wang *et al.*, 2007b).

Por otro lado, mediante genética reversa, se han generado varios clones infecciosos en los que está presente todo el genoma del VSRRP en forma de ADNc. En este sentido, varios trabajos han puesto de manifiesto la capacidad del ARN transcrito a partir de dichos clones, de generar una infección en el cerdo y producir una respuesta similar a la producida por los virus parentales (Kwon *et al.*, 2006; Key *et al.*, 2007; Truong *et al.*, 2004). En cuanto a la aplicación directa del uso de estos clones infecciosos en la generación de vacunas, tenemos un primer ejemplo basado en los estudios realizados por Verheije *et al.* (2003). Estos autores utilizaron un clon infeccioso basado en el virus Lelystad y generaron una serie de mutaciones para, entre otras cosas, incluir un marcador genético capaz de diferenciar entre animales vacunados y animales infectados y atenuar el virus recombinante generado. Sin embargo, la prueba de protección realizada en animales demostró que tras su utilización, los animales permanecieron virémicos y el virus fue transmitido a animales centinelas, así como únicamente se observó una protección parcial frente a la cepa homóloga del subtipo europeo y no frente a la heteróloga del subtipo americano.

No obstante, estas vacunas de nueva generación todavía se encuentran en fase experimental y su eficacia y seguridad es controvertida, por ello, las vacunas inactivadas y atenuadas se siguen considerando la mejor alternativa para la inmunización frente al VSRRP.

En cuanto a las vacunas inactivadas, la primera vacuna comercializada la desarrolló en España el laboratorio Cyanamid con el nombre de *Cyblue*[®] y contenía una cepa española del VSRRP inactivada que se administraba en adyuvante oleoso. Esta vacuna estaba indicada para la prevención de los problemas asociados a la reproducción en cerdas. Los estudios de campo indican un beneficio significativo en el número de cerdos destetados por cerda y año y su eficacia se ha establecido en un 80% de protección frente a la aparición de alteraciones de la reproducción frente a una cepa homóloga comparado con el 9% de protección natural en los testigos sin vacunar (Plana-Durán *et al.*, 1997b). No obstante, estudios posteriores han demostrado que la vacuna es ineficaz en la prevención de la enfermedad tanto cuando las hembras se infectan al comienzo de la gestación (Prieto *et al.*, 1997a) como cuando lo hacen al final de la misma (Scortti *et al.*, 2007), como queda demostrado por el hecho de que la vacunación no impide la viremia ni la infección transplacentaria. Sin embargo, la vacunación de cerdas antes de la cubrición proporciona una protección frente a la mortalidad neonatal en lechones nacidos de cerdas infectadas en el día 90 de gestación, mejorando así ciertos parámetros productivos en las cerdas vacunadas (Scortti *et al.*, 2007). Estos resultados positivos podrían ser debidos a una aparición más rápida de anticuerpos neutralizantes tras el desafío en las cerdas vacunadas, que serían transferidos de forma pasiva a sus lechones con la ingesta de calostro (Scortti *et al.*, 2007). La ineficacia de esta vacuna se ha constatado también en verracos, en los cuales la vacunación es incapaz de prevenir la infección y la eliminación del virus de desafío en el semen (Nielsen *et al.*, 1997).

En Estados Unidos, Laboratorios Bayer ha comercializado otra vacuna inactivada denominada PRRomise[®]. Los estudios de seguridad y eficacia llevados a cabo en hembras han demostrado que en los animales vacunados, la viremia posterior a la inoculación con una cepa virulenta es más corta que en los animales no vacunados, presentando los primeros mejores índices productivos.

Finalmente, los laboratorios Merial, han desarrollado una vacuna inactivada, a la que han denominado comercialmente *Progressis*[®], basada en una cepa europea del virus, que se administra con adyuvante oleoso. Esta vacuna está indicada para su aplicación en granjas previamente infectadas y en animales con inmunidad previa. Los resultados de los estudios de campo realizados en este tipo de explotaciones indican que su aplicación proporciona una mejoría en los parámetros productivos en las cerdas vacunadas (Gass-Cofre *et al.*, 2004), existiendo una correlación entre la vacunación múltiple y la eficacia reproductora en granjas con alta seroprevalencia (Papatsiros *et al.*, 2006). A su vez, Alno *et al.* (2000) han realizado pruebas de campo, llevando a cabo la vacunación de granjas con diferentes estados sanitarios en relación al SRRP. Estos autores han concluido que la vacuna puede considerarse una herramienta eficiente para mejorar el rendimiento productivo en piaras donde el VSRRP circule más activamente. Resultados similares han sido obtenidos por Reynaud *et al.* (2000) en una prueba de campo donde utilizaron 1514 cerdas primerizas y 3366 cerdas múltiparas. Sin embargo, en estudios experimentales la vacunación sólo es capaz de reducir el porcentaje de

lechones virémicos (Joisel *et al.*, 2003) a pesar de que la vacunación induce una potente respuesta inmunitaria de base celular (Piras *et al.*, 2005).

La falta de protección que se observa tras la vacunación de cerdos con vacunas inactivadas se atribuye habitualmente a la pobre respuesta inmune que inducen este tipo de vacunas, especialmente en relación con el desarrollo de anticuerpos neutralizantes, que no suelen aparecer tras la vacunación (Scortti *et al.*, 2007). Aunque de forma general se asume que las vacunas inactivadas no inducen el desarrollo de anticuerpos neutralizantes, recientemente se ha descrito una vacuna inactivada experimental que sí induce anticuerpos neutralizantes en los animales vacunados. No obstante, y de forma similar a lo que sucede con otras vacunas inactivadas, la protección que se obtiene es solo parcial (Vanhee *et al.*, 2009).

Debido a la falta de eficacia o eficacia limitada de las vacunas inactivadas (Meng 2000; Scortti *et al.*, 2007; Zuckermann *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2011), su uso para el control de la enfermedad es limitado y sólo se utilizan en algunos países europeos, normalmente de forma combinada con otras medidas como el uso de vacunas atenuadas. En concreto, es frecuente que se utilicen en cerdas gestantes. Esto se debe a que su empleo es seguro en este tipo de animales al tratarse de productos inactivados.

Las vacunas atenuadas existentes en el mercado en la actualidad han generado una gran polémica debido fundamentalmente a cuestiones relacionadas con la seguridad de las mismas. La mayoría de los estudios se han realizado con la vacuna viva atenuada comercializada por Boehringer (Ingelvac PRRS MLV/ReproTM) basada en la atenuación de la cepa de referencia americana ATCC VR-2332. De ella se sabe que el virus vacunal se replica en los animales vacunados y es capaz de persistir durante semanas en el organismo de los mismos (Gorcyca *et al.*, 1995, 1997b; Lager y Mengeling, 1997a; Mengeling *et al.*, 1996a, 1999a, 2003a; Canals *et al.*, 2000; Nodelijk *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2004) y también de eliminarse por distintas rutas, pudiendo transmitirse a animales susceptibles no vacunados (Bøtner *et al.*, 1997; Mengeling *et al.*, 1996a). Esta transmisión puede asimismo ser vertical ya que las cepas vacunales son capaces de atravesar la barrera placentaria y producir la infección de los fetos en desarrollo (Mengeling *et al.*, 1996a, 1996c) y también ser adquiridas por los lechones de su madres durante la lactación (Mengeling *et al.*, 1996a). Por otra parte, el uso en verracos conduce a la eliminación del virus vacunal en el semen de los animales vacunados durante periodos variables de tiempo (Christopher-Hennings *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 1997; Han *et al.*, 2011) e incluso puede producir alteraciones en la calidad espermática (Christopher-Hennings *et al.*, 1997). Aunque las pruebas de seguridad efectuadas en cerdas seronegativas vacunadas en el último tercio de gestación con dosis 10 veces superiores a las recomendadas no dan lugar a alteraciones en la reproducción (Gorcyca *et al.*, 1997a; Medveczky *et al.*, 2002), estudios de campo han demostrado que cuando se vacunan granjas por primera vez se produce un efecto negativo, especialmente en las cerdas que se encuentran entre el día 60 y 90 de gestación, en las que se observa un aumento en la tasa de momificados y en las que se encuentran al final de la gestación, en las que aparece un incremento en los nacidos muertos (Dewey *et al.*, 1999). Además, otros estudios han mostrado el desencadenamiento no sólo de estas alteraciones en los parámetros reproductivos sino también de otras reacciones adversas a la vacunación tales como reducción del apetito, agalaxia, repetición del ciclo e incluso

aparición de meningitis en lechones (Bouwkamp y Geudeke, 1999; Mortensen y Søgaard, 1999).

En lo que a seguridad se refiere, hay que tener presente que existe un riesgo potencial de recombinación de las cepas vacunales con cepas que circulen en la población, pudiendo dar lugar a la reversión a virulencia o incluso a nuevas cepas que sean más virulentas que las existentes antes de la vacunación. Esta recombinación parece estar probada, al menos en el caso de la vacuna Ingelvac PRRS MLV/ReproTM (Bøtner *et al.*, 1997; Mengeling *et al.*, 1999b), aunque muy posiblemente este hallazgo sea extensible a otras vacunas. De hecho, Meng (2000) describió la aparición de problemas reproductivos asociados al VSRRP en cerdas vacunadas con esta vacuna en Dinamarca, sugiriendo que el virus vacunal había revertido a una cepa virulenta y posteriormente, Nielsen *et al.* (2001, 2002) apoyaron esta hipótesis, sugiriendo que la presión negativa a la que se vio sometido el virus vacunal en el animal podría haber sido la responsable de mutaciones genéticas que podrían haber estado implicadas en su reversión a la virulencia. En este sentido, Opriessnig *et al.* (2002) compararon las características moleculares y biológicas de dos aislados de campo y esta vacuna y observaron que uno de ellos, el 98-38803 deriva de la misma.

En relación a las pruebas de eficacia, los resultados hallados en la literatura son dispares y ello obedece a que la eficacia de la vacuna depende del tipo de cepa con que se realice el desafío. Aparentemente se consigue una buena protección cuando el desafío se realiza con su cepa parental ya que no sólo se evita la aparición de los síntomas asociados a la reproducción tales como abortos tardíos o partos prematuros, siendo las camadas de los animales vacunados en cuanto al número de lechones nacidos vivos, muertos y momificados y en cuanto al crecimiento de los lechones similares a las de los testigos no infectados, sino que también se consigue reducir la diseminación del virus (Cano *et al.*, 2007a, b; Linhares *et al.*, 2012). Además, la viabilidad de los lechones es superior a la de los procedentes de madres no vacunadas (Gorcyca *et al.*, 1995; Desrosiers, 2000) sin que se haya podido demostrar el nacimiento de lechones infectados *in utero* (Gorcyca *et al.*, 1996b, 1997a). Cuando el desafío se realiza con una cepa heteróloga la eficacia de estas vacunas varía (Hu y Zhang, 2014). Se palian los problemas asociados a la reproducción, aunque la protección que se consigue es parcial ya que todavía es posible detectar infección transplacentaria en algunas camadas y la presencia del virus en la madre (Gorcyca *et al.*, 1997; Roof *et al.*, 1999; Van Woensel *et al.*, 2000). Así, se ha descrito infección trasplacentaria de embriones y, ocasionalmente la muerte, en cerdas previamente inmunizadas con esta vacuna e inseminadas con semen infectado con una cepa europea del VSRRP (Han *et al.*, 2012a). Sin embargo, los efectos sobre los parámetros productivos, así como la tasa de infección transplacentaria son menores que en las cerdas no vacunadas (Gorcyca *et al.*, 1997a, 1997b; Mengeling *et al.*, 1998, 1999a; Osorio *et al.*, 1998; Lager *et al.*, 2003; Schagemann y Kump, 1999; Eger, 2000; Egbering, 2002). Sin embargo, en el caso de los verracos, a diferencia de los resultados obtenidos por Nielsen *et al.* y Christopher-Hennings *et al.*, en 1997 en los que se observó que se conseguía una protección parcial, limitándose el periodo de viremia y la eliminación del virus en el semen tras la contraprueba, Han *et al.* en 2011 observaron que esta disminución en la eliminación en semen del virus solo ocurría tras un desafío homólogo tratando de explicar esta discrepancia de resultados con la diversidad genética existente dentro del mismo genotipo europeo. Finalmente, en los animales en crecimiento también se produce cierto grado de protección, disminuyendo la duración de la

viremia tras la contraprueba y apreciándose una disminución de las lesiones asociadas a la infección (Van Woensel *et al.*, 1998; Mengeling *et al.*, 2003a), aunque, en ocasiones, el comportamiento de los animales vacunados no es muy diferentes del de los animales no vacunados en relación con la persistencia del virus, tanto en sangre como en el pulmón, y su eficacia queda en entredicho (Van Woensel *et al.*, 1998; Labarque *et al.*, 2003a). Es más, aunque los animales vacunados muestren una protección parcial, la vacunación previa no es capaz de disminuir la eliminación del virus de campo tras el desafío, produciéndose la infección de centinelas puestos en contacto con los animales vacunados (Nodelijk *et al.*, 2001).

Por otra parte, en un estudio realizado por Nilubol *et al.* (2003) se evaluó la eficacia de la utilización de esta VVM combinada con la vacuna inactivada *PRRomiSe*[®]. Sin embargo, los resultados obtenidos son muy similares a los presentados por el grupo vacunado únicamente con la VVM, apreciándose un ligero ascenso del título de anticuerpos neutralizantes y una leve disminución de la sintomatología clínica.

Actualmente también se encuentra en el mercado la vacuna viva atenuada *Ingelvac*[®]*PRRS ATP*, comercializada por Boehringer Ingelheim y basada en la atenuación de la cepa “atípica” JA 142 del VSRRP mediante pases en cultivo celular. Esta vacuna ha demostrado ser segura en lechones de 2 ó 3 semanas de edad, no observándose el desencadenamiento de ningún tipo de sintomatología clínica post-vacunal, pero ha sido posible su detección en suero después de más de 28 días tras la inoculación (Johnson *et al.*, 2004). Estudios realizados por Roof *et al.* (2003) sugieren que pese a que la vacunación con esta vacuna no produce inmunidad esterilizante, induce un cierto grado de protección frente a la aparición de lesiones pulmonares ocasionadas tanto por la infección con la cepa VR-2332 como con una cepa “atípica” del VSRRP. La evaluación de la respuesta inmune producida por la vacunación sugiere la existencia de una respuesta inmune de tipo celular débil e inconstante (Xiao *et al.*, 2003, 2004).

Los datos existentes para otras vacunas vivas atenuadas indican un comportamiento similar al de la vacuna de Boehringer. Así una vacuna comercializada por Schering-Plough Animal Health bajo el nombre de PrimePac PRRS[®], basada en una cepa de genotipo americano, produce una viremia detectable después de la vacunación e incluso es posible la transmisión del virus vacunal a centinelas puestos en contacto con los animales vacunados (Hesse *et al.*, 1997; Hutchinson *et al.*, 1997) y la eliminación el virus en el semen (Hutchinson *et al.*, 1997). En términos de eficacia se ha demostrado que la vacunación brinda una buena protección frente a una cepa homóloga, aunque no es capaz de prevenir la infección con una cepa heteróloga pudiéndose detectar viremia en los animales vacunados tras el desafío (Hesse *et al.*, 1996a, b). Recientes estudios han demostrado la similitud existente entre este virus vacunal y las cepas responsables de los brotes atípicos del SRRP (Key *et al.*, 2001). Como consecuencia de ello se ha planteado la hipótesis de que modificaciones genéticas originadas en el virus vacunal dieran lugar a cepas de mayor patogenicidad.

De la misma forma, la vacuna viva atenuada basada en una cepa de genotipo europeo comercializada por Laboratorios Intervet S. A. (PorcilisPRRS[®]) produce una viremia detectable en los animales vacunados (Stadejek *et al.*, 1999) y, en lo que a protección se refiere, la alcanzada frente a cepas heterólogas del mismo genotipo varía desde una disminución en la

viremia hasta su completa desaparición (Van Woensel *et al.*, 1998), mientras que la conseguida frente a una cepa heteróloga de genotipo americano es prácticamente nula (Van Woensel *et al.*, 2000; Labarque *et al.*, 2004). Sin embargo, pruebas de campo han probado que su administración a animales en crecimiento reduce los signos clínicos y las lesiones pulmonares a la enfermedad, así como la incidencia de patógenos secundarios, mejorando el rendimiento de los lechones al destete en lo que se refiere a ganancia media diaria, índice de conversión y días al matadero cuando se compara con grupos no vacunados (Kritas *et al.*, 1999; Mavromatis *et al.*, 1999; Stadejek *et al.*, 1999; Pejsak *et al.*, 2000). Además, en el año 2005, Alexopoulos *et al.* llevaron a cabo un estudio de campo que consistió en comparar en una granja infectada endémicamente de VSRRP los parámetros reproductivos de cerdas a las que se les había administrado esta vacuna con cerdas control, observándose una mejora significativa de la tasa de parto, siendo esta de un 89% respecto del 78% observado en el grupo control, además de una menor tendencia a la vuelta al estro, un menor número de partos prematuros y de agalaxia post-parto y un mayor número de lechones vivos al nacimiento y al destete en cada camada tras la vacunación pudiendo concluir de esta manera que la vacunación en granjas infectadas endémicamente tiene efectos beneficiosos tanto en salud como en fertilidad.

Posteriormente, los laboratorios Fort Dodge desarrollaron y obtuvieron la licencia de comercialización de otra vacuna viva atenuada denominada *FDL PRRS MLV*®. Los estudios de seguridad aplicados a lechones de 3 semanas de edad han demostrado que la aplicación de esta vacuna no produce reacciones adversas locales ni sistémicas incluso en dosis 100 veces superiores a las empleadas habitualmente (Srinivasappa *et al.*, 1999). Sin embargo, se ha observado transmisión del virus vacunal a animales centinela. Los estudios de seguridad llevados a cabo en hembras gestantes demuestran que la administración de esta vacuna en el día 85 de gestación, ya sea en dosis simples, repetidas o dos veces y media la dosis normal, no produce ninguna alteración patológica antes ni después del parto (Srinivasappa *et al.*, 1999).

Finalmente, en España se comercializan dos vacunas atenuadas basadas en dos cepas españolas del virus: Amervac PRRS® (comercializada por Laboratorios Hipra S.A.) y Pyrsvac-183® (comercializada por Laboratorios Syva). En cuanto a la seguridad de las cepas en que se basan las vacunas, hay que destacar que la aplicación intranasal de las cepas vacunales no produce signos clínicos de enfermedad, aunque la infección a la que dan lugar se puede demostrar por el desarrollo de anticuerpos específicos, así como por el aislamiento del virus en muestras de sangre tomadas entre los días 3 y 5 p.i. (Martínez-Lobo *et al.*, 2008). Su aplicación en el día 90 de gestación, puede conducir a alteraciones en la duración normal de la gestación, pudiendo, ocasionalmente, producir partos prematuros o tardíos, así como el nacimiento de lechones nacidos débiles y lechones infectados *in utero*, aunque en baja proporción (menor del 5,5%). Sin embargo, la aplicación de ambas vacunas da lugar al desarrollo de una respuesta inmune de base humoral con el desarrollo de anticuerpos detectables por ELISA y de anticuerpos neutralizantes con títulos de entre 1:8 y 1:16. Tras el desafío se observa una disminución de la sintomatología clínica asociada a la infección, un acortamiento del período de viremia y un menor efecto en la reproducción basado en el porcentaje de lechones nacidos muertos y momificados, así como en los nacidos débiles, y la mortalidad en lactación cuando se compara los valores de las cerdas vacunadas con los obtenidos en las cerdas testigos. Además, aunque ninguna de las vacunas es capaz de impedir la infección transplacentaria, hay que destacar que su aplicación disminuye la probabilidad de que suceda y, también, la

incidencia de lechones infectados. De todo lo expuesto, se puede deducir, de forma resumida, que el comportamiento de las vacunas vivas españolas es similar al publicado para las vacunas americanas ya que producen viremias detectables tras la vacunación y pueden atravesar la barrera placentaria y dar lugar a infecciones congénitas, aunque tienen a su favor que limitan de forma importante los signos clínicos asociados a la infección, presentando un comportamiento sustancialmente mejor que el de las cerdas no vacunadas tras un desafío con una cepa heteróloga virulenta (Scotti *et al.*, 2006a).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Como se ha comentado anteriormente, a lo largo del tiempo se han desarrollado diversas medidas de control y prevención frente al SRRP debido a la relevancia de esta enfermedad en la industria porcina, desde el punto de vista económico, a nivel mundial. Éstas no sólo se tratan de medidas de naturaleza higio-sanitaria sino también de naturaleza médica, lo que ha dado lugar a la comercialización de diversas vacunas para el control de la enfermedad tanto en los reproductores como en los animales en crecimiento, entre las que se incluyen vacunas inactivadas y vacunas atenuadas. No obstante, dada la falta de eficacia que presentan las vacunas inactivadas (Osorio *et al.*, 1998; Scotti *et al.*, 2006; Zuckermann *et al.*, 2007), en la actualidad, las vacunas más utilizadas en los programas de control de la enfermedad en todos los países productores de porcino del mundo son las vacunas vivas atenuadas.

Sin embargo, a pesar de la amplia comercialización de los diversos productos desarrollados por diferentes laboratorios, éstos han generado una gran polémica debido, fundamentalmente, a cuestiones relacionadas con la seguridad de las mismas. Estas sospechas derivan tanto de los resultados de estudios llevados a cabo en condiciones experimentales como de indicios procedentes de la aplicación de dichas vacunas en condiciones de campo. Además, hay que tener presente que existe un riesgo potencial de recombinación de las cepas vacunales con cepas que circulen en la población, pudiendo dar lugar a la reversión a virulencia o incluso a nuevas cepas que sean más virulentas que las existentes antes de la vacunación.

Estas sospechas se basan en la observación en varios estudios sobre la replicación del virus vacunal en los animales vacunados siendo capaz de persistir durante semanas en el organismo de los mismos (Gorcyca *et al.*, 1995, 1997b; Lager y Mengeling, 1997a; Mengeling *et al.*, 1996a, 1999a, 2003a; Canals *et al.*, 2000; Nodelijk *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2004) y, también, de eliminarse por distintas rutas, pudiendo transmitirse a animales susceptibles no vacunados (Bøtner *et al.*, 1997; Mengeling *et al.*, 1998).

Además, otros estudios han mostrado el desencadenamiento no sólo de estas alteraciones en los parámetros reproductivos sino también de otras reacciones adversas a la vacunación tales como reducción del apetito, agalaxia, repetición del ciclo e incluso aparición de meningitis en lechones (Bouwkamp y Geudeke, 1999; Mortensen y Søgaaard, 1999). Esto ha sido probado, al menos, en el caso de la vacuna Ingelvac PRRS MLV/Repro™ (Bøtner *et al.*, 1997; Mengeling *et al.*, 1999b), aunque, muy posiblemente, este hallazgo sea extensible a otras vacunas.

Sin embargo, todos los estudios anteriormente mencionados están realizados en condiciones experimentales distintas y han sido realizados por grupos de investigación diferentes. Ésto hace que los resultados obtenidos en los distintos experimentos sean difícilmente comparables ya que la edad y el estado fisiológico y/o productivo de los animales utilizados son diferentes, así como el diseño experimental seguido en relación con la toma y análisis de muestras y con los parámetros clínicos y virológicos evaluados.

Como resultado, en la actualidad resulta imposible determinar si existen diferencias en la seguridad de las distintas vacunas vivas atenuadas existentes en el mercado, a pesar de los diversos trabajos realizados encaminados a conocer la seguridad de las mismas.

Por tanto, el objetivo general de este estudio es comparar la seguridad de las cuatro vacunas vivas atenuadas que se comercializan en España bajo las mismas condiciones experimentales con el fin de concluir si, en función de este parámetro, la aplicación de alguna de ellas resulta más adecuada o, por el contrario, todas ellas pueden considerarse seguras de forma similar.

Para la consecución de este objetivo general, se han diseñado tres objetivos específicos:

1. Determinar la inocuidad del producto vacunal a la dosis recomendada por el fabricante y sobre la especie animal para la que va destinada.
2. Determinar la capacidad de replicación *in vivo* de cada uno de los virus atenuados que componen las distintas vacunas.
3. Determinar la capacidad de transmisión de los distintos virus atenuados a animales centinelas que han sido puestos en contacto con los animales vacunados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CULTIVOS CELULARES

3.1.1. CULTIVOS PRIMARIOS DE MAPs

Los MAPs se obtuvieron a partir de pulmones de lechones de tres semanas de edad procedentes de una explotación libre del VSRRP.

Para su obtención, fue necesario realizar el sacrificio de los lechones mediante la administración intraperitoneal de una sobredosis (80 mg/kg de peso vivo) de pentobarbital sódico (Dolethal®, Vétoquinol, Francia) y posterior exanguinación del animal mediante la sección de la vena axilar. Inmediatamente después se extrajeron los pulmones y, en condiciones de esterilidad, se realizaron tres lavados con una solución salina tamponada estéril (PBS) con un pH de 7,4 y la siguiente composición 137 mM de Na_2HPO_4 (Merck, Alemania), 2,68 mM de KCl (Merck, Alemania), 147 mM de KH_2PO_4 (Merck, Alemania) y 16,3 mM de Na_2HPO_4 (Merck, Alemania). Esta solución de lavado se suplementó con una mezcla antibiótica en cantidad suficiente para alcanzar una concentración final de 300 UI/ml de penicilina, 300 µg/ml de estreptomina y 0,75 µg/ml de anfotericina B (Gibco-BRL). El PBS recuperado del lavado pulmonar se centrifugó a 650 x g durante 15 minutos y el sedimento fue resuspendido en medio de cultivo celular Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco, EE.UU.), con un pH de 7,4 y tamponado con NaHCO_3 (Merck, Alemania) a una concentración de 3,7 g/l y HEPES (Gibco, EE.UU.) a una concentración de 25mM y suplementado con la mezcla antibiótica ya descrita (denominado DMEM para cultivos de MAPs). Posteriormente, se volvió a centrifugar a 650 x g durante 10 minutos y el sedimento obtenido se resuspendió en 50 ml de DMEM para cultivo de MAPs. Tras este paso, se procedió al recuento de los macrófagos utilizando una cámara de Neubauer y se ajustó la concentración de los mismos a $1,3 \times 10^6$ células/ml mediante la adición de DMEM para cultivo de MAPs suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco, EE.UU.). Los MAPs se distribuyeron en placas de cultivo celular estériles de 96 pocillos (Nunc, EE.UU.) añadiendo a cada pocillo 200 µl de la suspensión de MAP anteriormente preparada. Finalmente, los cultivos se introdujeron en una estufa a 37°C y una atmósfera con un 5% de CO_2 .

Estos cultivos de MAPs se utilizaron para determinar la presencia del VSRRP mediante la técnica de aislamiento vírico en las distintas muestras biológicas obtenidas en el estudio.

3.1.2. CULTIVO Y MANTENIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR ESTABLE MARC-145

La línea celular estable MARC-145 es un clon altamente permisivo a la replicación del VSRRP que deriva de la línea celular MA-104, la cual es una línea epitelial derivada de riñón de mono (Kim *et al.*, 1993).

Las células se conservaron en congelación en nitrógeno líquido (-196°C), en criotubos estériles de 2 ml, resuspendidas en un volumen de 1 ml de SFB con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, Alemania), a una concentración de 4×10^6 células MARC-145/ml. Para su utilización las células se descongelaron en un baño maría a 37°C y se resuspendieron delicadamente en un frasco de cultivo celular de 25 cm² de superficie que contenía 1 mL de SFB (para alcanzar una concentración final del 10%) y 9 ml de medio de cultivo celular de mantenimiento consistente en DMEM suplementado con 2,2 g/l de NaHCO₃, 15 mM de HEPES, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 0,25 µg/ml de anfotericina B. Las células se incubaron durante 5 horas a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂. Pasado este tiempo, se sustituyó el medio de cultivo por otro suplementado de igual manera con el objetivo de eliminar los restos de DMSO.

Para el mantenimiento de la línea celular se realizaron pases seriados. Para ello se desprendió el tapiz confluyente con tripsina-versene al 0,25% (Gibco, EE.UU). Una vez desprendido, se neutralizó la tripsina con SFB (1% del volumen de tripsina), y se resuspendieron las células en medio de cultivo celular de mantenimiento. Tras este paso, se procedió al recuento de las células utilizando una cámara de Neubauer y se calculó su concentración. Finalmente se añadió el volumen que contuviera $2,5 \times 10^5$ células a un frasco de cultivo celular de 25 cm² de superficie. Al frasco de cultivo se añadió 1 ml de SFB (para alcanzar una concentración final del 10%) y la cantidad de medio de cultivo de mantenimiento necesaria para alcanzar un volumen final de 10 ml. Los frascos de cultivo se mantuvieron en una estufa a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂ hasta que el tapiz estuviera nuevamente confluyente, momento en el que se realizó un nuevo pase.

3.2. VACUNAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron las cuatro vacunas vivas atenuadas disponibles comercialmente en España. Tres de ellas son de genotipo 1 y la cuarta es de genotipo 2. Las características de las vacunas utilizadas son las siguientes:

-Ingelvac® PRRS MLV: Es una vacuna producida y comercializada por los Laboratorios Boehringer-Ingelheim (Alemania) y está elaborada con un derivado atenuado por pases en cultivo celular de la cepa de referencia del genotipo 2 del virus (VR-2332), aislada en EE.UU. en 1992. La vacuna se presenta liofilizada y se aplica sin adyuvante, conteniendo cada dosis, según el fabricante, una concentración mínima de $10^{4,9}$ dosis infectivas 50 para cultivo de tejido (DI₅₀CT/ml).

-Amervac® PRRS: Es una vacuna producida y comercializada por los Laboratorios Hipra, S.A. (Girona, España) que está elaborada con la cepa VP-046bis. Esta cepa procede de la cepa 5710 que fue aislada en la provincia de Gerona (España) en 1991 y ha sido atenuada por pases seriados (n=18) en cultivos de la línea celular estable MA-104. La vacuna se presenta liofilizada y se aplica sin adyuvante, conteniendo cada dosis, según el fabricante, una concentración mínima de $10^{3,5}$ DI₅₀CT/ml.

-*Pyrsvac-183*[®]: Es una vacuna producida y comercializada por los Laboratorios Syva S.A. (León, España) que está elaborada con la cepa ALL-183 del VSRRP. Esta cepa fue aislada en la provincia de Murcia en 1991 y fue atenuada mediante pases seriados (n= 183) en la línea celular estable ST, que es una línea epitelial de testículo de cerdo. La vacuna se presenta liofilizada y se aplica sin adyuvante, conteniendo cada dosis, según el fabricante, una concentración mínima de 10^5 DI₅₀CT/ml.

-*Porcilis*[®] PRRS: Es una vacuna producida y comercializada por los Laboratorios Intervet S.A. (Holanda), actualmente MSD, que está elaborada con un derivado atenuado mediante pases seriados en cultivo celular de la cepa DV del VSRRP. Esta cepa se aisló en Holanda en 1992. La vacuna se presenta liofilizada y se aplica con el adyuvante Diluvac Forte[®] (Intervet, S.A.) que consiste en α -tocoferol. Cada dosis contiene, según el fabricante, un mínimo de 10^4 DI₅₀CT/ml.

3.3.DISEÑO EXPERIMENTAL

3.3.1. ANIMALES E INSTALACIONES

Para la consecución de los objetivos de este estudio se utilizaron ciento veinte lechones cruce de Landrace x Large White, de 3 semanas de edad, seronegativos mediante la técnica de ELISA indirecto (IDEXX, EE.UU.) al VSRRP y procedentes de una granja libre de la enfermedad. Los animales fueron distribuidos de forma aleatoria en cinco grupos (A, B, C, D y E) de veinticuatro animales cada uno y alojados en condiciones de aislamiento en cuadras con cama de viruta, agua y pienso de primeras edades (Setna, S.A. España) *ad libitum*.

3.3.2. INOCULACIÓN EXPERIMENTAL

En el día 0 del experimento, tras un período de aclimatación de 7 días, cada grupo de veinticuatro lechones fue dividido en dos subgrupos, uno de quince animales y otro de nueve. Los nueve lechones de cada subgrupo fueron separados y alojados en una cuadra independiente en aislamiento. Los quince cerdos restantes de los Grupos A, B, C y D fueron vacunados con las vacunas comerciales Ingelvac[®] PRRS MLV, Amervac[®] PRRS, Pyrsvac-183[®] y Porcilis[®] PRRS, respectivamente. Todas las vacunas fueron aplicadas por la vía intramuscular en las tablas del cuello siguiendo las instrucciones de los respectivos fabricantes.

El Grupo E se utilizó como grupo control y en los quince animales pertenecientes a este grupo, simulando la vacunación, se empleó el sobrenadante de un cultivo en células MARC-145 como agente inoculante.

En el día 3 del experimento, los nueve cerdos de cada grupo que no habían sido vacunados fueron alojados de nuevo en sus respectivos grupos, en contacto directo con los animales vacunados, para que actuaran como centinelas.

3.3.3. TOMA DE MUESTRAS

En los días 0, 3, 6, 9, 12, 15 y 18 del experimento se tomaron muestras de sangre de todos los animales utilizados en el estudio, con independencia de que actuaran como centinelas o hubieran sido vacunados. Las muestras se tomaron, tras la inmovilización de los animales, mediante punción de la vena cava anterior, utilizando el sistema de extracción de sangre Vacutainer® (Becton Dickinson Vacutainer Systems Europe, Francia) en tubos siliconados de 10 ml sin anticoagulante. En el caso de los animales centinelas, las muestras de sangre se analizaron mediante RT-PCR y se retiraron del grupo tan pronto como se detectaron como virémicos.

Los mismos días en que se tomaron muestras de sangre, se tomaron muestras de secreciones nasales, orales y de heces de todos los animales. Para la toma de todas estas muestras se utilizaron hisopos de algodón estériles que fueron introducidos inmediatamente después de su obtención en tubos estériles de 3 ml que contenían 2 ml de DMEM.

En los días 7, 14 y 21 del experimento se sacrificaron cinco de los lechones vacunados de cada uno de los grupos experimentales. Antes del sacrificio se tomaron muestras de sangre, de secreciones nasales, orales y de heces, siguiendo el mismo procedimiento descrito en el párrafo anterior. Tras el sacrificio se realizó la necropsia completa de cada lechón y en la misma se obtuvieron muestras de distintos órganos, incluyendo pulmón, tonsila, timo, bazo, íleon y nódulos linfáticos submandibulares, inguinales superficiales, mediastínicos y mesentéricos. Las muestras obtenidas en la necropsia fueron colocadas en bolsas estériles debidamente identificadas hasta su uso posterior.

En el día 24 del experimento se sacrificaron todos los animales centinelas pero en este caso no se llevó a cabo una necropsia completa sino que únicamente se tomaron muestras de sangre.

3.4. EVALUACIÓN DE SÍNTOMAS Y LESIONES PULMONARES

Desde el día -3 (i.e. tres días antes de la inoculación experimental) hasta el final del estudio se midió y registró diariamente la temperatura rectal de cada uno de los animales. Asimismo, se realizó una valoración clínica, asignando un valor a cada individuo según el baremo que aparece reflejado en la Tabla 1.

Tabla 1: Baremo de puntuación utilizado para la evaluación de la sintomatología observada en los animales expuestos al VSRRP de forma experimental.

SIGNOS CLÍNICOS		
Categoría	Tipo	Puntuación
Sistémicos	Normal	0
	Erizamiento del pelo	0,5
	Depresión	1
	Anorexia	2
	Letargia	3
Cutáneos	Normal	0
	Cianosis	1
Digestivos	Normal	0
	Diarrea leve	1
	Diarrea profusa	2
Respiratorios	Normal	0
	Estornudos	1
	Tos/Secreción nasal	2
	Respiración superficial	3
	Respiración abdominal	4
Frecuencia Respiratoria	Menor de 45/minuto	0
	Entre 45 y 59/minuto	1
	Mayor o Igual a 60/minuto	2

Durante la necropsia de los animales se valoraron las lesiones macroscópicas presentes en el pulmón siguiendo el método utilizado por Halbur *et al.* (1995), que asigna a cada animal un valor correspondiente a la suma del porcentaje de lesión pulmonar observado en cada uno de los lóbulos pulmonares.

Para la evaluación de la presencia y gravedad de las lesiones microscópicas, fundamentalmente neumonía intersticial, tres muestras de aproximadamente 10 cm³ obtenidos del lóbulo intermedio izquierdo se fijaron mediante la inmersión durante 24 horas en formalina tamponada al 10% (Merck, Alemania). Posteriormente, las muestras se deshidrataron mediante el uso seriado de alcoholes de diferente graduación y, finalmente, se incluyeron en parafina. Una vez incluidos, se cortaron 2 secciones consecutivas de 4 µm de grosor de cada una de las muestras. Una de ellas se tiñó con hematoxilina-eosina (HE) y la otra

se procesó para la detección del antígeno del VSRRP mediante la técnica de inmunohistoquímica.

Para llevar a cabo la tinción histológica se desparafinaron los cortes de pulmón sumergiéndolos en xilol (Merck, Alemania) durante 10-15 minutos para eliminar los restos de parafina. Posteriormente, las muestras se hidrataron mediante pases seriados de 5 minutos cada uno por alcohol absoluto, alcohol de 96° y alcohol de 70°. Una vez hidratadas las muestras se lavaron en H₂O destilada y se sumergieron en hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich, Alemania) durante 8 minutos. Pasado ese tiempo las muestras se lavaron durante 10 minutos con agua corriente y se aclararon en H₂O destilada para eliminar los restos del colorante. A continuación se sumergieron 10 veces en alcohol de 96° y se contrastaron con eosina (Sigma-Aldrich, Alemania) durante 1 minuto. Finalmente, las muestras se deshidrataron de nuevo mediante pases seriados por alcohol de 70°, 96° y absoluto y se dejaron 10 minutos en xilol (Merck, Alemania) antes de realizar el montaje definitivo con DPX® (Merck, Alemania).

Las secciones de pulmón teñidas con HE fueron evaluadas visualmente utilizando un microscopio óptico (Nikon, Japón) a 400x aumentos, en un ensayo ciego. A cada muestra se le confirió una puntuación estimada en función de la gravedad de la neumonía intersticial observada utilizando el sistema de puntuación desarrollado por Halbur *et al.* (1995), que se resume en la Tabla 2.

Tabla 2: Baremo de puntuación desarrollado por Halbur et al. (1995) y utilizado para evaluar la gravedad de las lesiones microscópicas producidas por el VSRRP en el pulmón de los animales inoculados experimentalmente.

Puntuación	Lesiones
0	No existen lesiones microscópicas
1	Neumonía intersticial leve
2	Neumonía intersticial multifocal moderada
3	Neumonía intersticial difusa moderada
4	Neumonía intersticial grave

3.5.DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL VSRRP EN LAS MUESTRAS OBTENIDAS

3.5.1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras de sangre se dejaron a temperatura ambiente durante una hora para favorecer la coagulación. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 1200 x g durante 15 minutos a 4°C. El suero se recogió en condiciones de esterilidad y se distribuyó en alícuotas, que se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su posterior utilización para aislamiento vírico y detección de anticuerpos.

Todos los hisopos se mantuvieron en refrigeración durante su procesamiento. Para ello se recogió el medio de cultivo en el que habían sido sumergidos los hisopos con la ayuda de una aguja 20G x 11/2" y se filtró por filtros de jeringa de 0,22 µm de tamaño de poro (Millipore, EE.UU). El líquido obtenido se almacenó a -80°C, en tubos de 2 ml estériles hasta su utilización para la determinación de la presencia del VSRRP.

Todos los órganos fueron almacenados tras su obtención a -80°C hasta su procesamiento. Para ello, las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente. Posteriormente, se pesó 1 g de cada órgano y se maceró con medio de cultivo celular de mantenimiento en la proporción de 1:9 (peso: volumen) utilizando un homogeneizador automático (Stomacher®, Seward, Reino Unido). Los macerados fueron centrifugados a 1200 x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se recogió asepticamente, se filtró a través de filtros de jeringa de 0,22 µm de tamaño de poro y se guardó en tubos estériles a -80°C hasta su posterior utilización.

3.5.2. DETECCIÓN DEL VSRRP MEDIANTE AISLAMIENTO VÍRICO EN LAS MUESTRAS OBTENIDAS

Para realizar el aislamiento vírico a partir de las muestras obtenidas se emplearon cultivos primarios de MAPs preparados según se ha descrito en el apartado 3.1.1. y cultivos de la línea celular estable MARC-145, mantenidos según se especifica en el apartado 3.1.2.

En el caso de los cultivos de MAPs, para la determinación de la presencia del VSRRP en las distintas muestras biológicas se utilizaron placas de cultivo celular de 96 pocillos. Una vez sembrados los MAPs y tras dieciocho horas de incubación a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂, se retiró el medio de cultivo de los pocillos y se inocularon cuatro pocillos por muestra, utilizando como inóculo 100 µl de cada una de las muestras por pocillo. Al cabo de una hora de adsorción a 37°C, se añadieron 100 µl de DMEM para cultivo de MAPs suplementado con un 20% de SFB (para conseguir una concentración final de SFB del 10%).

Para determinar la sensibilidad a la infección por el VSRRP de los lotes de MAPs obtenidos se inocularon cultivos de cada uno de los lotes con 10³, 10², 10 y 1 DI₅₀CT/pocillo de la cepa del VSRRP Sp-2 (5710), utilizada por nuestro grupo de investigación en numerosos estudios experimentales (Prieto *et al.*, 1996a, 1996b, 1997a, 1997b, 2003, 2004, 2008; Scotti *et al.*, 2006a, 2007). Solamente se utilizaron aquellos lotes de MAPs en los cuales al menos el 50% de los pocillos inoculados con 1 DI₅₀CT mostraron el ECP característico del virus.

La lectura de las placas se realizó mediante la detección de ECP compatible con el VSRRP en los días 4, 5 y 6 post-inoculación.

En el caso de los cultivos de la línea celular estable MARC-145, se utilizaron placas de cultivo celular de 24 pocillos en las que se sembraron 5×10^4 células/pocillo en un volumen final de 1 ml de DMEM de mantenimiento suplementado con un 10% de SFB. Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ durante 24 horas. Pasado este tiempo, se retiró el medio de cultivo y se inocularon por duplicado 200 µl de cada una de las muestras/pocillo. Posteriormente, las placas se mantuvieron en adsorción durante 1 hora en una estufa a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂. Posteriormente, se añadió 1 ml/pocillo de medio de mantenimiento suplementado con un 5% de SFB.

Como testigos negativos se utilizaron dos pocillos/placa, inoculados con medio de cultivo celular de mantenimiento suplementado con un 5% de SFB.

La lectura de las placas se realizó mediante la detección de ECP compatible con el VSRRP en los días 4, 5 y 6 post-inoculación.

3.5.3. TITULACIÓN DE LAS MUESTRAS POSITIVAS POR AISLAMIENTO VÍRICO

Las muestras biológicas que dieron un resultado positivo por aislamiento vírico fueron tituladas para determinar la cantidad de virus presente en cada una de ellas. La titulación se realizó por duplicado, en placas de 96 pocillos que habían sido sembradas 24 horas antes con 1×10^4 células/pocillo en el caso de las células MARC-145 y con 2×10^5 células/pocillo en el caso de los MAPs. Para llevar a cabo el procedimiento se realizaron diluciones seriadas en base diez desde 10^{-1} hasta 10^{-8} de cada una de las muestras en medio de cultivo celular de mantenimiento, en el caso de las titulaciones en MARC-145 y en DMEM para cultivo de MAPs en el caso de las titulaciones en cultivos de MAPs. Posteriormente, se inocularon 100 µl de cada dilución en cada uno de los 8 pocillos que constituyen una columna de una placa de cultivo celular de 96 pocillos previamente sembradas con el tipo celular adecuado. Los pocillos restantes de la placa actuaron como testigo y se inocularon con 100 µl/pocillo de medio de cultivo celular de mantenimiento o de DMEM para cultivo de MAPs. Tras un período de adsorción de 1 hora a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂, se añadieron 100 µl/pocillo de medio de cultivo celular de mantenimiento con un 10% de SFB, en el caso de las titulaciones en la línea celular MARC-145, y 100 µl/pocillo de DMEM para cultivo de MAPs suplementado con un 20% de SFB, en el caso de los cultivos de MAPs.

Las placas se mantuvieron en una estufa a 37°C con un 5% de CO₂ hasta su lectura para determinar la presencia de ECP en los días 4, 5 y 6 p.i. El cálculo del título vírico se realizó utilizando el método de Reed y Muench (1938) y el título de virus se expresó como DI₅₀CT/ml en el caso de las muestras de suero y de los hisopos y como DI₅₀CT/g en el caso de las muestras de los órganos recogidos en la necropsia.

3.5.4. DETECCIÓN DEL VSRRP MEDIANTE LA TÉCNICA DE RT-PCR

La detección del VSRRP en las muestras clínicas y la confirmación de la presencia del VSRRP en las muestras positivas por aislamiento vírico se realizó mediante la técnica de RT-PCR, amplificando un fragmento de la ORF5 del virus.

Para ello, se extrajo el ARN vírico a partir de las distintas muestras biológicas utilizando un sistema comercial basado en la afinidad del ARN vírico por una membrana de gel de sílice, *QIAamp®Viral RNA* (QIAGEN, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Posteriormente, el ARN extraído se utilizó como molde en una técnica de RT-PCR, que se llevó a cabo en tubos de 0,2 ml de tapa redonda y en un volumen final de 50 µl utilizando un kit comercial de reacción en un solo tubo (*OneStep RT-PCR kit*, QIAGEN, Alemania) que contiene una concentración de 2,5 mM de MgCl₂. La mezcla de reacción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante y contenía:

- Buffer QIAGEN OneStep RT-PCR 5x 10 µl
- Solución Q 5x..... 10 µl
- Mezcla de dNTPS (10 mM de cada uno) 2 µl
- Inhibidor de ARNasas (RNasin 20 U/µl) 0,5 µl
- Oligonucleótido directo (25 mM)..... 1 µl
- Oligonucleótido inverso (25 mM) 1 µl
- Mezcla de enzimas (transcriptasa inversa + ADN polimerasa) 2 µl
- H₂O 8,5 µl
- Muestra 15 µl

Como control negativo se utilizó H₂O de biología molecular libre de ADNasas y ARNasas estéril y como control positivo se utilizaron 15 µl de ARN extraído de un cultivo de MAPs infectado con la cepa Sp-2 del VSRRP.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para amplificar la ORF7 del virus a partir de las muestras obtenidas de animales expuestos a las vacunas de genotipo 1 fueron los denominados LV7 (Martínez Lobo *et al.*, 2011b) y los utilizados para amplificar la ORF5 del virus a partir de las muestras obtenidas de los animales expuestos a la vacuna de genotipo 2 fueron los denominados Wes (Wesley *et al.*, 1998). Las secuencias de los mismos son las siguientes:

- LV7D: 5'GAGAAAGCCCGGACTAACATCA 3'
- LV7R: 5'CCATCGCGGCCATTACAC 3'
- WesD: 5'CCATTCTGTTGGCAATTTGA 3'
- WesR: 5'GGCATATATCATCACTGGCG 3'

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Mastercycler gradient®, Eppendorf, Alemania) utilizando el siguiente programa:

- Un ciclo de un segmento a temperatura de 50°C durante 30 minutos.
- Un ciclo de un segmento a 95°C de temperatura durante 15 minutos.
- 40 ciclos, cada uno de ellos de tres segmentos:
 - Segmento 1: 94°C durante 30 segundos
 - Segmento 2: 61,5°C en el caso de los cebadores LV y 58°C en el caso de los cebadores Wes durante 30 segundos
 - Segmento 3: 72°C durante 1 minuto.
- Un ciclo de un segmento a 72°C durante 10 minutos.

La visualización de los productos de la RT-PCR se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Cambrex, EE.UU.) al 1% preparados en TBE (Tris base 89,2 mM (Merck, Alemania), ácido bórico 89 mM (Merck, Alemania), EDTA 2 mM (Merck, Alemania)), teñidos con bromuro de etidio (Sigma-Aldrich, Alemania) a la concentración de 0,1 µg/ml.

La electroforesis se llevó a cabo en líquido en TBE, a una intensidad de corriente eléctrica de 50 voltios durante 1 hora. Las bandas fueron visualizadas bajo luz ultravioleta en un transiluminador. La especificidad de las mismas se confirmó estimando su tamaño mediante la comparación de las mismas con un patrón de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder, Invitrogen, EE.UU.).

3.5.5. DETECCIÓN DEL VSRRP MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA

La técnica de inmunohistoquímica se llevó a cabo sobre una de las secciones consecutivas de 4 µm de grosor obtenidas de cada una de las muestras de pulmón fijadas en formalina, deshidratadas en alcohol y parafinadas, siguiendo un procedimiento desarrollado por Halbur *et al.* (1994). Para llevar a cabo el procedimiento, las muestras se desparafinaron con xilol y se hidrataron mediante pases seriados por alcoholes de distintas graduaciones como se ha descrito en el apartado 3.4. Posteriormente, se procedió al desenmascaramiento antigénico utilizando proteasa XIV (Sigma-Aldrich, Alemania) al 0,1% en tampón Tris salino (TBS) (50 mM Trizma Base (Sigma-Aldrich, Alemania), 154 mM NaCl (Merck, Alemania), pH 8,4), durante 8 minutos a 37 °C. A continuación, se inhibió la peroxidasa endógena mediante la incubación de las muestras durante 30 minutos en H₂O₂ al 3% (Merck, Alemania) en metanol (Merck, Alemania) y, tras lavar las muestras tres veces durante 5 minutos en tampón TBS, las preparaciones se bloquearon con TBS suplementado con un 2% del soroalbumina bovina (Sigma-Aldrich, Alemania) durante 1 hora para evitar uniones inespecíficas.

Pasado este tiempo, los cortes se incubaron durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda con el anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal 1AC7 (Ingenasa, Madrid, España)) específico de la proteína de la nucleocapside (ORF7) de ambos genotipos del VSRRP diluido en la proporción 1:250 en PBS-Tween (PBS-T) (PBS 0,01 M, Tween 20 (Biorad, Alemania) al 0,05%). Posteriormente, las preparaciones se lavaron tres veces durante 5 minutos en tampón

TBS y se incubaron en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpos secundario, un anticuerpo anti-ratón desarrollado en cabra biotinilado a la dilución 1:300 (Sigma-Aldrich, Alemania). A continuación, las secciones se lavaron tres veces durante 5 minutos en tampón TBS y se trataron con estreptavidina conjugada con peroxidasa (Zymed Laboratories, EE.UU.) a la dilución 1:400 en cámara húmeda durante 60 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar tres veces durante 5 minutos con TBS, la tinción se reveló con DAB (diaminobencidina) y H₂O₂. Para ello se preparó, inmediatamente antes de su uso, una solución 18,5 mM de tetrahidrocloreto de 3,3'-diaminobenzidina (Sigma-Aldrich, Alemania) en TBS pH 7,6 con un 0,08% de H₂O₂ al 30% (Merck, Alemania) en la que se incubaron las muestras durante 10 minutos. Las muestras se contrastaron con hematoxilina de Mayer durante 5 minutos y, a continuación, se lavaron, se deshidrataron mediante incubaciones seriadas en alcoholes de graduación creciente y xilol y se montaron en medio de montaje rápido DPX®. Como testigo negativo se utilizó una muestra que no se incubó con el anticuerpo primario. Además, cortes de pulmón, procedentes de lechones negativos y positivos al VSRRP de la misma edad, de otros estudios llevados a cabo de forma paralela por nuestro grupo de investigación, se utilizaron como testigos negativos y positivos.

Finalmente, las preparaciones se observaron en un microscopio óptico (Nikon, Japón) a 400x aumentos y se examinaron al menos 20 campos. A la cantidad de antígeno observada se le dio una puntuación de 0 a 3 como una estimación del número de focos de células positivas por campo. Un foco de células positivas se definió como un área estudiada a 400x aumentos en la cual se observaron al menos de 3 a 5 células positivas. Una muestra obtuvo una puntuación de 0 cuando no se detectaron células positivas en la misma; de 1 cuando se detectaron entre 1 y 5 focos de células positivas por campo; de 2 cuando se observaron entre 6 y 10 focos de células positivas por campo y de 3 cuando se observaron más de 10 focos de células positivas por campo. El examen de las preparaciones se realizó de forma ciega.

3.6.DETECCIÓN DE ANTICUERPOS TOTALES FRENTE AL VSRRP

Para la detección de anticuerpos totales frente al VSRRP en las muestras de suero obtenidas se utilizó un kit comercial de ELISA indirecto (HerdChek PRRS 2XR®, Laboratorios IDEXX, EE.UU.) que se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura de las placas se realizó en un espectrofotómetro para placas de ELISA (Thermo Labsystems, Finlandia) utilizando un filtro de 620 nm. Para el cálculo de los resultados se consideraron positivos todos aquellos sueros para los cuales el cociente entre la densidad óptica de la muestra y la del suero utilizado como control positivo (S/P) fue mayor de 0,4.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico de los resultados de la prueba se llevó a cabo utilizando el programa informático GraphPad Prism 5.0. (GraphPad Software Inc., EE.UU.).

Mientras que para la evaluación de los signos clínicos y parámetros productivos los datos de los cinco grupos fueron comparados, en el caso de la evaluación de los parámetros virológicos sólo los datos de los Grupos A, B, C y D se compararon.

Para la comparación de las temperaturas rectales de los animales vacunados de cada grupo, antes y después de la vacunación, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas.

La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis se utilizó para determinar la existencia de diferencias en la gravedad de los signos clínicos y de las lesiones pulmonares microscópicas, así como para el análisis del porcentaje de superficie pulmonar afectada y la determinación de la presencia del virus mediante inmunohistoquímica en los distintos grupos. Cuando se observaron diferencias estadísticamente significativas se compararon los grupos dos a dos utilizando la prueba de U de Mann-Whitney.

Para la comparación del título vírico en las muestras biológicas y del valor S/P obtenido para los distintos sueros procedentes de los animales de los distintos grupos experimentales se realizó un test de ANOVA de un factor. Cuando se observaron diferencias estadísticamente significativas, se compararon los grupos dos a dos aplicando el método de comparaciones múltiples de Duncan.

La prueba F de Fisher se utilizó para determinar la existencia de diferencias en la proporción de muestras positivas por el método del aislamiento vírico entre los distintos grupos experimentales.

Todas las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el valor p fue inferior a 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. SIGNOS CLÍNICOS

Ninguno de los animales control o vacunados experimentalmente, con independencia del grupo al que perteneciera, alcanzó en ninguno de los días del experimento temperaturas consideradas febriles (i.e. temperaturas rectales superiores a 40°C). Es más, en ninguno de los grupos se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la temperatura media de los animales en los días previos a la inoculación y las temperaturas registradas tras la vacunación. Las temperaturas medias registradas para cada uno de los grupos experimentales desde el día -3 hasta el final del experimento, en el día 21 post-vacunación, junto con la desviación estándar, aparecen reflejadas en la Tabla 3.

Tabla 3: Temperaturas rectales medias registradas para cada grupo experimental desde tres días antes de la vacunación hasta el final del experimento en el día +21.

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
Día	Media±DS	Media±DS	Media±DS	Media±DS	Media±DS
-3	39,5±0,4	39,6±0,3	39,6±0,3	39,1±0,2	39,5±0,3
-2	39,8±0,2	39,7±0,2	39,8±0,2	39,8±0,2	39,5±0,2
-1	39,8±0,2	39,9±0,1	39,9±0,1	39,9±0,1	39,8±0,2
0	39,5±0,2	39,4±0,3	39,7±0,2	40,0±0,1	39,8±0,3
1	39,3±0,3	39,4±0,3	39,8±0,2	39,8±0,2	39,6±0,2
2	39,2±0,4	39,3±0,3	39,4±0,4	39,8±0,1	39,5±0,3
3	39,5±0,2	39,4±0,3	39,6±0,3	39,6±0,4	39,7±0,2
4	39,3±0,3	39,5±0,3	39,6±0,3	39,6±0,3	39,7±0,2
5	39,5±0,2	39,5±0,2	39,5±0,3	39,6±0,3	39,6±0,3
6	39,4±0,3	39,8±0,3	39,8±0,3	39,4±0,4	39,7±0,2
7	39,4±0,3	39,5±0,3	39,8±0,3	40,0±0,3	39,7±0,2
8	39,3±0,3	39,4±0,3	39,8±0,6	39,6±0,2	39,7±0,2
9	39,3±0,2	39,5±0,3	39,6±0,4	39,7±0,2	39,6±0,2
10	39,7±0,3	39,7±0,2	39,9±0,2	39,3±0,4	39,6±0,2
11	39,4±0,5	39,3±0,3	39,4±0,5	39,9±0,1	39,6±0,2
12	39,8±0,2	39,4±0,2	39,7±0,2	39,5±0,3	39,6±0,2
13	39,3±0,2	39,3±0,5	39,1±0,7	39,6±0,3	39,5±0,2
14	39,5±0,3	39,4±0,2	39,8±0,5	39,3±0,2	39,6±0,2
15	39,8±0,2	39,5±0,2	39,8±0,3	39,4±0,1	39,7±0,2
16	39,5±0,3	39,4±0,1	39,3±0,3	39,7±0,1	39,7±0,1
17	39,1±0,3	39,5±0,2	39,3±0,3	39,4±0,2	39,6±0,2
18	39,2±0,1	39,4±0,1	39,2±0,2	39,6±0,2	39,5±0,2
19	39,4±0,2	39,5±0,1	39,9±0,1	39,4±0,1	39,6±0,1
20	39,2±0,3	39,4±0,2	39,2±0,5	39,8±0,1	39,5±0,1
21	39,3±0,6	39,6±0,1	39,5±0,3	39,1±0,4	39,6±0,1

Por otra parte, el registro de los signos clínicos observados tras la inoculación experimental de los animales de los distintos grupos, permite concluir que la vacunación de los animales no da lugar a la aparición de signos clínicos, ni específicos ni inespecíficos, siendo 0 la puntuación obtenida por cada uno de los animales a lo largo del período de estudio.

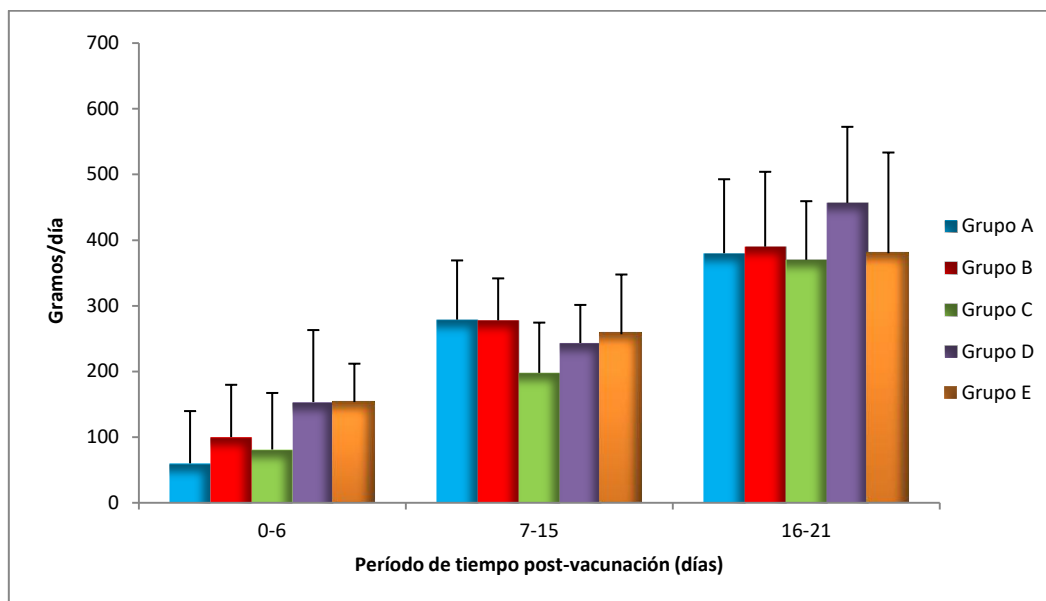
Finalmente, para estimar el efecto que la vacunación pudiera tener sobre el crecimiento se tomaron los pesos de los animales cada tres días. Los pesos medios de los animales de cada grupo, junto con la desviación estándar, en cada uno de los días en los que se midió este parámetro aparecen reflejados en la Tabla 4. En general, los pesos medios de los animales aumentaron a lo largo del estudio en todos los grupos, salvo entre el día 0 y el día 3 del experimento, momento en que se produjo una leve disminución de peso en la mayoría de los grupos. Esto explica que, cuando se estudiaron las ganancias medias diarias de peso en las tres semanas en las que se dividió el estudio, los valores obtenidos durante la primera semana post-vacunación, aunque positivos, fueron mucho más bajos que los registrados en las dos semanas siguientes (Figura 1). Además, en la Figura 1 se observa que la velocidad de crecimiento difirió entre los grupos experimentales en los distintos períodos considerados. No obstante, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas en ninguno de los períodos, como tampoco lo fueron las diferencias en los pesos registrados en los distintos días del estudio.

Tabla 4: Peso medio de los animales vacunados en cada uno de los grupos experimentales en los distintos días en los que se registró este parámetro.

Día del experiment	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E
0	7,1 ± 0,6 ^a	6,9 ± 0,6	6,9 ± 0,6	6,8 ± 0,4	6,9 ± 0,8
3	6,9 ± 0,8	6,6 ± 0,6	6,7 ± 0,5	7,0 ± 0,5	8,1 ± 1,1
6	7,4 ± 0,9	7,5 ± 0,8	7,4 ± 0,8	7,8 ± 0,8	7,9 ± 1,0
7	7,7 ± 0,9	7,8 ± 1,1	8,1 ± 0,5	7,5 ± 0,7	9,1 ± 1,4
9	8,6 ± 1,2	8,5 ± 0,8	7,8 ± 0,8	8,3 ± 0,9	8,9 ± 1,5
12	8,8 ± 1,2	9,1 ± 0,9	8,0 ± 1,0	8,6 ± 0,8	9,3 ± 1,5
14	9,7 ± 1,5	9,7 ± 0,9	8,9 ± 0,8	9,8 ± 1,4	11,1 ± 0,8
15	10,1 ± 1,8	10,1 ± 1,3	8,9 ± 1,1	10,4 ± 0,9	9,1 ± 1,2
18	11,7 ± 2,0	11,6 ± 1,4	9,7 ± 1,4	10,6 ± 1,1	9,8 ± 1,9
21	12,4 ± 2,2	12,4 ± 1,6	11,1 ± 1,4	13,1 ± 1,2	11,4 ± 1,8

^aMedia ± desviación estándar del peso de los animales

Figura 1: Ganancia media diaria de los cerdos vacunados de cada uno de los grupos experimentales en los distintos períodos del experimento.



4.2. LESIONES

En la necropsia de cada uno de los animales se registró el porcentaje de superficie pulmonar que presentaba lesiones compatibles con el VSRRP. El porcentaje medio de superficie pulmonar afectada en los cerdos vacunados y cerdos control en los días 7, 14 y 21 del experimento se muestra en la Tabla 5.

Como se puede deducir de los valores medios reflejados en esta tabla, ninguna lesión macroscópica fue registrada en los cerdos pertenecientes al grupo control. Las lesiones macroscópicas encontradas en el pulmón de los animales vacunados fueron moderadas o estuvieron ausentes en todos los grupos experimentales en los distintos días del experimento. Es destacable que en todos los grupos expuestos a cepas vacunales de origen europeo la superficie de pulmón afectada fue disminuyendo desde el día 7 p.v. hasta el final del experimento en el día 21 p.v., mientras que en el único grupo expuesto a una cepa vacunal de genotipo 2, el porcentaje de superficie pulmonar afectada fue aumentando con el tiempo, siendo prácticamente nulo en el día 7 p.v. y alcanzando valores similares a los obtenidos en este día por las cepas de genotipo 1 en el día 21 p.v. Además, los valores más bajos de lesión pulmonar se registraron en los animales del Grupo D, vacunados con la vacuna comercial *Porcilis® PRRS*. Sin embargo, a pesar de las leves diferencias observadas entre los distintos grupos experimentales, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas en ninguno de los días del experimento.

Tabla 5: Porcentaje medio de superficie pulmonar afectada en los días 7, 14 y 21 p.v. en cada uno de los grupos experimentales.

Grupo	Día de Necropsia		
	Día 7 p.v.	Día 14 p.v.	Día 21 p.v.
A	0,5 ± 0,9 ^a	1,4 ± 1,1	2,3 ± 2,4
B	2,2 ± 1,6	1,6 ± 2,2	0,6 ± 0,9
C	2,4 ± 3,3	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
D	0,7 ± 0,8	0,7 ± 1,1	0,0 ± 0,0
E	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

^aMedia ± desviación estándar de los resultados de lesión pulmonar macroscópica

La valoración media de las lesiones microscópicas encontradas en el pulmón los días 7, 14 y 21 p.v. en cada grupo experimental aparece reflejada en la Tabla 6. En este caso, tampoco se registró ninguna lesión microscópica en aquellos animales pertenecientes al grupo control. Igual que sucedía con el porcentaje de superficie pulmonar afectada, la gravedad de la neumonía intersticial observada en los animales vacunados, con independencia al grupo al que pertenecieran fue leve o moderada. Curiosamente, la gravedad de las lesiones microscópicas tendió a aumentar con el tiempo, registrándose los valores más altos en el día 21 p.v. para todos los grupos. Por otra parte, los grupos que presentaron menor incidencia y gravedad en la neumonía intersticial registrada fueron los Grupos C y D. Así, en el Grupo A, seis de los quince animales (40%) presentaron lesiones microscópicas, siendo éstas leves en tres animales y moderadas en los otros tres y en el Grupo B siete de sus quince componentes (46,7%) presentaron lesiones, siendo éstas leves en seis de los animales y moderadas en los restantes. Por el contrario, en el Grupo C sólo un animal (6,7%) presentó lesiones microscópicas consideradas leves y en el Grupo D este tipo de lesiones leves se registraron en tres de los quince integrantes del grupo (20%). No obstante, las diferencias entre grupos fueron estadísticamente significativas únicamente en el día 21 p.v. En concreto, existieron diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia con la que se observaron lesiones cuando se compararon los Grupos A y B (en los que el 100% de los animales presentaron algún grado de lesión) con el Grupo C (en el que sólo un animal presentó lesiones microscópicas en el pulmón) y E y también en la gravedad de las lesiones cuando se compararon los Grupos A y B (que presentaron las lesiones más graves) con el Grupo C (que presentó las lesiones más leves) y E y también cuando se comparó el Grupo A (el que presentó las lesiones más graves) con el Grupo D (que mostró lesiones de gravedad intermedia) y E.

Tabla 6: Valores medios de lesiones microscópicas observadas en los días 7, 14 y 21 p.v. en cada uno de los grupos experimentales.

Grupo	Día de Necropsia		
	Día 7 p.v.	Día 14 p.v.	Día 21 p.v.
A	0,2 ± 0,4 ^a	0,0 ± 0,0	1,6 ± 0,5
B	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,5	1,2 ± 0,4
C	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,4
D	0,2 ± 0,4	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,5
E	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

^aMedia ± desviación estándar de los resultados de lesión pulmonar microscópica

4.3.DETECCIÓN DEL VSRRP EN LOS CERDOS VACUNADOS

4.3.1. VIREMIA

En ninguno de los animales pertenecientes al Grupo E se detectó viremia con independencia del tipo de cultivo celular utilizado para el aislamiento del VSRRP.

Los resultados de aislamiento vírico obtenidos a partir de las muestras de suero recogidas en los distintos días p.v. y procedentes de cada uno de los cerdos que constituyen los distintos grupos experimentales A, B, C, D se recogen en la Tabla 7. En ella se observa que todas las cepas vacunales indujeron viremia en los cerdos vacunados, aunque el número de cerdos positivos varió en función del grupo al que pertenecían, el día en que se tomaron las muestras y el tipo de cultivo celular utilizado para el aislamiento.

Así, cuando el aislamiento del virus se llevó a cabo en la línea celular MARC-145 la mayoría de los animales fueron positivos desde el día 6 p.v. hasta el final del estudio, sin que se observaran diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia de aislamiento vírico entre los distintos grupos experimentales. Sin embargo, en el día 3 p.v. la mayoría de las muestras obtenidas de los animales de los Grupos A y B fueron positivas mientras que todas las muestras procedentes de los animales de los Grupos C y D fueron negativas, siendo las diferencias en la frecuencia de detección del virus estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0,05$). Además, el número total de muestras de suero positivas obtenidas tras la vacunación varió dependiendo del grupo considerado (96% para cerdos del Grupo A, 88% para cerdos del Grupo B, 64% para cerdos del Grupo C y 57,3% para cerdos del Grupo D).

Tabla 7: Resultados de aislamiento vírico en la línea celular MARC-145 y en cultivos primarios de MAPs a partir de las muestras de suero obtenidas de los cerdos vacunados de los distintos grupos experimentales a lo largo del estudio.

Días post-vacunación	Aislamiento en MARC - 145								Aislamiento en MAPs							
	Grupos								Grupos							
	A	%	B	%	C	%	D	%	A	%	B	%	C	%	D	%
0	0/15 ^a	0	0/15	0	0/15	0	0/15	0	0/15	0	0/15	0	0/15	0	0/15	0
3	12/15	80	14/15	93.3	0/15	0	0/15	0	0/15	0	0/15	0	0/15	0	0/15	0
6	15/15	100	14/15	93.3	14/15	93.3	11/15	73.3	0/15	0	0/15	0	0/15	0	0/15	0
7	5/5	100	5/5	100	5/5	100	3/5	60	0/5	0	0/5	0	0/5	0	0/5	0
9	10/10	100	8/10	80	6/10	60	8/10	80	0/10	0	0/10	0	0/10	0	0/10	0
12	10/10	100	8/10	80	9/10	90	8/10	80	1/10	10	3/10	30	0/10	0	0/11	0
14	5/5	100	4/5	80	3/5	60	4/5	80	1/5	20	1/5	20	0/5	0	0/5	0
15	5/5	100	5/5	100	3/5	60	3/5	60	0/5	0	0/5	0	0/5	0	0/5	0
18	5/5	100	4/5	80	4/5	80	4/5	80	0/5	0	1/5	20	0/5	0	0/5	0
21	5/5	100	4/5	80	4/5	80	2/5	40	1/5	20	0/5	0	0/5	0	0/5	0

^a: Número de muestras positivas/ número de muestras analizadas

Estos resultados de aislamiento vírico contrastan con los obtenidos cuando se utilizaron cultivos primarios de MAPs para la determinación de la presencia del VSRRP en las muestras de suero de los animales vacunados. En este último caso, la mayoría de las muestras fueron negativas, siendo especialmente llamativo el hecho de que no fuera posible aislar el virus de ninguna de las muestras procedentes de los animales vacunados con las vacunas Pyrsvac®-183 y Porcilis® PRRS. Por el contrario, en el caso de los animales vacunados con las vacunas Ingelvac® PRRS MLV y Amervac® PRRS, algunas muestras (tres en el primer grupo y cinco en el segundo) fueron positivas por aislamiento vírico en cultivos del MAPs, pero sólo a partir del día 12 p.v. No obstante, en este caso las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas.

La cantidad de virus presente en las muestras de suero que fueron positivas por aislamiento vírico se cuantificó mediante titulación vírica en cultivo celular. En el caso de las muestras positivas en cultivos de MAPs, la cantidad de virus presente fue tan baja que no se pudo cuantificar, estando en todos los casos la carga vírica por debajo de 10 DI₅₀CT/ml, que es el límite de cuantificación. Por el contrario, en el caso de las muestras positivas en cultivos de la línea celular estable MARC-145, la cantidad de virus presente, aunque variable, estuvo en general muy por encima del límite de detección. Los resultados de titulación vírica en la línea celular MARC-145 de las muestras de suero de los animales vacunados de los distintos grupos experimentales que fueron positivas por aislamiento vírico se muestran en las Tablas 8, 9, 10 y 11 y se representan en la Figura 2. Como se observa en las tablas, los títulos víricos fueron variables, en función del animal estudiado y el día de determinación. Es destacable que los títulos medios más altos registrados durante todo el estudio se obtuvieron en el Grupo A

durante la última semana del experimento. Por el contrario, los títulos medios tendieron a ser más bajos en el Grupo C que en el resto de grupos durante todo el experimento (Figura 2). No obstante, las diferencias registradas no fueron estadísticamente significativas en ningún día del experimento.

Tabla 8: Resultados de titulación vírica en cultivos de la línea celular MARC-145 de las muestras de suero procedentes de animales pertenecientes al Grupo A.

Cerdo	Días post-vacunación								
	D3	D6	D7	D9	D12	D14	D15	D18	D21
1	2,8 ^a	3,5	3,5						
2	2,3	2,8	2,8						
3	1,7	2,5	2,5						
4	1,8	3	3						
5	-	1,5	2						
6	1,7	2,2		2,4	2,7	3,5			
7	1,8	3,3		1,7	3,3	3,5			
8	2	2,7		2,7	2,1	<1,0 ^b			
9	1,5	2,5		1,5	2,5	2,2			
10	2,2	2,5		2	2,7	2,2			
11	2,3	3,3		3,5	3,8		3,8	4,3	2,6
12	-	2,7		2,5	3,4		2,8	2,3	1,6
13	1,2	3,2		3,5	3,5		4,6	4,5	3,5
14	-	2,8		3,4	3,6		3,8	3,8	2,4
15	1,7	1		2,8	3,3		3,8	3	3,3
Media ± DE^c	1,9 ± 0,4	2,6 ± 0,7	2,8 ± 0,6	2,6 ± 0,7	3,1 ± 0,6	2,5 ± 1,1	3,8 ± 0,6	3,6 ± 0,9	2,7 ± 0,8

^aEl título vírico está expresado en forma de log₁₀ DI₅₀CT/ml de suero

^bPara calcular el título medio a todas las muestras positivas cuyo título estaba por debajo del límite de cuantificación se les ha asignado un valor de 0,9

^cDE: desviación estándar

Tabla 9: Resultados de titulación vírica en cultivos de la línea celular MARC-145 de las muestras de suero procedentes de animales pertenecientes al Grupo B.

Cerdo	Días post-vacunación								
	D3	D6	D7	D9	D12	D14	D15	D18	D21
21	3,0 ^a	2,4	2,5						
22	1,5	2,3	2,6						
23	2,7	2,8	2,6						
24	3,8	4,3	3,5						
25	1	4,4	4						
26	3,8	3,7		3,6	5	5,3			
27	1,5	3,6		<1,0 ^b	3,5	2,8			
28	2,3	1,7		-	-	2			
29	1,7	2,3		4	3,3	2,6			
30	-	-		-	<1,0	-			
31	1,7	2,8		1	3,2		4,8	5,2	4,6
32	2,7	3,5		2,2	<1,0		3	1,5	-
33	2,5	3		2,2	<1,0		1,3	3	3,2
34	2,5	3,5		<1,0	-		3	3,4	<1,0
35	3,8	4,1		2,8	2,3		<1,0	-	3,2
Media ± DE^c	2,5 ± 0,9	3,2 ± 0,8	3,0 ± 0,7	2,2 ± 1,2	2,5 ± 1,5	3,2 ± 1,5	2,6 ± 1,6	3,3 ± 1,5	3,0 ± 1,5

^aEl título vírico está expresado en forma de log₁₀ DI₅₀CT/ml de suero

^bPara calcular el título medio a todas las muestras positivas cuyo título estaba por debajo del límite de cuantificación se les ha asignado un valor de 0,9

^cDE: desviación estándar

Tabla 10: Resultados de titulación vírica en cultivos de la línea celular MARC-145 de las muestras de suero procedentes de animales pertenecientes al Grupo C.

Cerdo	Días post-vacunación								
	D3	D6	D7	D9	D12	D14	D15	D18	D21
41	-	2,5 ^a	2,5						
42	-	2,6	2,5						
43	-	2,8	2,5						
44	-	2,5	2,8						
45	-	2,5	2,5						
46	-	2,8		-	-	-			
47	-	2,5		1	<1,0	1,4			
48	-	2,8		<1,0	2,7	-			
49	-	2,4		2,3	1,8	1,5			
50	-	3,2		2,5	3	2,4			
51	-	<1,0 ^b		2,2	2		-	1	3,3
52	-	2,5		-	1,5		-	1,8	2,6
53	-	-		-	1,5		2	-	-
54	-	3,4		2,5	2,5		3,5	1,6	<1,0
55	-	1,5		-	<1,0		3,3	3,3	3
Media ± DE^c	-	2,5 ± 0,6	2,6 ± 0,1	1,9 ± 0,7	1,9 ± 0,8	1,8 ± 0,6	2,9 ± 0,8	1,9 ± 1,0	2,5 ± 1,1

^aEl título vírico está expresado en forma de log₁₀ DI₅₀CT/ml de suero

^bPara calcular el título medio a todas las muestras positivas cuyo título estaba por debajo del límite de cuantificación se les ha asignado un valor de 0,9

^cDE: desviación estándar

Tabla 11: Resultados de titulación vírica en cultivos de la línea celular MARC-145 de las muestras de suero procedentes de animales pertenecientes al Grupo D.

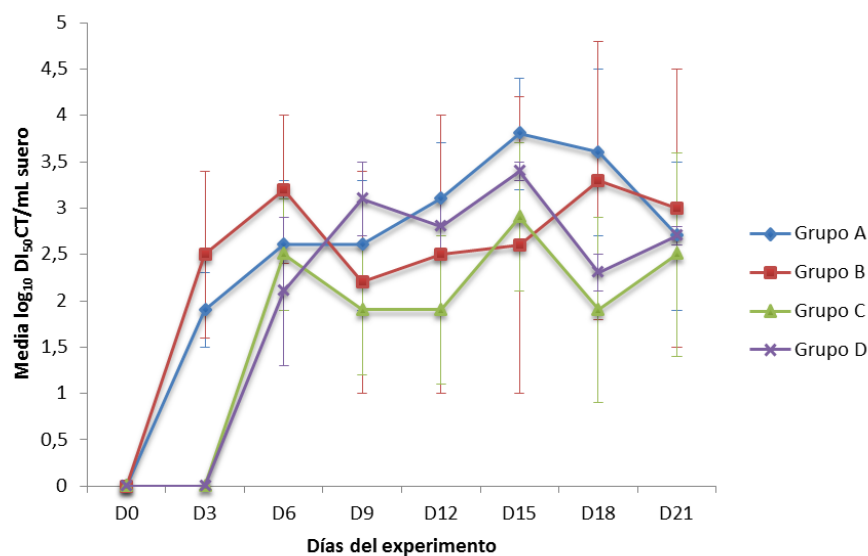
Cerdo	Días post-vacunación								
	D3	D6	D7	D9	D12	D14	D15	D18	D21
61	-	1,3 ^a	1,6						
62	-	3	4,2						
63	-	-	2,6						
64	-	-	-						
65	-	-	-						
66	-	2,4		3,3	2,8	2,6			
67	-	3,4		3,2	3,2	2,8			
68	-	2,5		3,4	3,2	2,5			
69	-	<1,0 ^b		2,5	2,5	1,3			
70	-	2,7		2,5	2,5	-			
71	-	-		-	-		-	2,2	-
72	-	2,5		3,2	3,3		3,3	2,2	2,6
73	-	1,7		3,2	2,6		3,5	2,2	-
74	-	<1,0		-	-		-	-	-
75	-	2		3,5	2,6		3,3	2,6	2,8
Media \pm DE^c	-	2,1 \pm 0,8	2,8 \pm 1,3	3,1 \pm 0,4	2,8 \pm 0,3	2,3 \pm 0,7	3,4 \pm 0,1	2,3 \pm 0,2	2,7 \pm 0,1

^aEl título vírico está expresado en forma de \log_{10} DI₅₀CT/ml de suero

^bPara calcular el título medio a todas las muestras positivas cuyo título estaba por debajo del límite de cuantificación se les ha asignado un valor de 0,9

^cDE: desviación estándar

Figura 2: Título vírico medio obtenido en cultivos de la línea celular estable MARC-145 a partir de las muestras de suero positivas por aislamiento vírico procedentes de los animales vacunados en los distintos grupos experimentales cada uno de los días p.v. analizados.



4.3.2. DISTRIBUCIÓN ORGÁNICA

En ninguna de las muestras de tejido pertenecientes a los animales del grupo control se aisló el virus. Sin embargo, los resultados de aislamiento vírico en la línea celular MARC-145 a partir de las muestras de tejido recogidas de los cerdos vacunados de los Grupos A, B, C y D en los distintos días de necropsia se muestran en la Tabla 12. Como se puede observar en dicha tabla, todos los animales vacunados portaban el virus, al menos en uno de sus órganos, en el momento del sacrificio, con independencia del grupo al que pertenecieran o el tiempo transcurrido tras la vacunación. La frecuencia global de aislamiento del VSRRP obtenida para cada uno de los grupos experimentales a partir de cada uno de los órganos analizados aparece resumida en la Tabla 13 y representada en la Figura 3.

Como se puede observar en la Tabla 13 y en la Figura 3, la frecuencia de aislamiento del virus fue variable y dependiente del órgano y del grupo considerado. Así, el órgano en el que se determinó la presencia del VSRRP con mayor frecuencia fue la tonsila, con un total de 49 muestras positivas de las 60 analizadas (lo que corresponde a un porcentaje de positividad del 81,67%). En segundo lugar en cuanto a frecuencia de aislamiento se refiere se situaron los nódulos linfáticos submandibulares, ya que 33 y 36 de las muestras tomadas de los nódulos linfáticos submandibulares izquierdo y derecho, respectivamente, fueron positivas por aislamiento vírico (lo que corresponde a una frecuencia de aislamiento del 55% y del 60,0%, respectivamente). Similar frecuencia de aislamiento se registró para las muestras del nódulo linfático mediastínico, en el que 33 muestras fueron positivas (es decir, el 55%). Por el contrario, el órgano del que se aisló el VSRRP con menor frecuencia fue el bazo ya que sólo 13 muestras de 60 (el 21,67%) fueron positivas. Sin embargo, a pesar de las diferencias numéricas observadas entre grupos, únicamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se comparó la frecuencia global de aislamiento vírico en las muestras de bazo, con independencia del día de necropsia, entre el Grupo B y el resto de grupos estudiados y cuando se comparó la frecuencia de aislamiento vírico en las muestras de nódulos linfáticos mesentéricos entre el Grupo B y el Grupo D ($p < 0,05$).

Si consideramos el efecto del grupo en la frecuencia de aislamiento del VSRRP, se observa que el virus se aisló, considerando todos los órganos, con una frecuencia superior en las muestras procedentes de los cerdos del Grupo B, en el que un total de 116 muestras sobre las 180 analizadas fueron positivas por aislamiento vírico (lo que corresponde a un porcentaje de muestras positivas del 64,44%). En una situación intermedia se situó el Grupo A, en el que un total de 75 muestras de las 180 tomadas fueron positivas (es decir, el 41,67%). Por el contrario, la frecuencia de aislamiento fue bastante menor en los Grupos C y D en los cuales únicamente 68 y 61 de las 180 muestras tomadas (es decir, el 37,78% y el 33,89%), respectivamente, fueron positivas por aislamiento vírico. No obstante, las diferencias en la frecuencia con la que se pudo determinar la presencia del VSRRP en las muestras de tejido analizadas solo fueron estadísticamente significativas cuando se compararon los resultados del Grupo B con el resto de grupos experimentales ($p < 0,0001$).

Tabla 12: Resultados de aislamiento vírico en la línea celular MARC-145 a partir de las muestras de los distintos tejidos recogidos en la necropsia de los cerdos vacunados de cada grupo experimental.

Órgano	Grupo A			Grupo B			Grupo C			Grupo D		
	Día de necropsia			Día de necropsia			Día de necropsia			Día de necropsia		
	7 p.v.	14 p.v.	21 p.v.	7 p.v.	14 p.v.	21 p.v.	7 p.v.	14 p.v.	21 p.v.	7 p.v.	14 p.v.	21 p.v.
Pulmón	0/5 ^a	3/5	5/5	3/5	4/5	3/5	0/5	1/5	2/5	1/5	2/5	2/5
Tonsila	5/5	4/5	5/5	4/5	4/5	5/5	4/5	4/5	5/5	2/5	4/5	3/5
Íleon	3/5	1/5	2/5	4/5	2/5	3/5	2/5	1/5	2/5	2/5	2/5	1/5
Tímo	1/5	0/5	3/5	2/5	3/5	3/5	1/5	0/5	2/5	2/5	2/5	1/5
Bazo	0/5	0/5	1/5	2/5	3/5	4/5	0/5	1/5	0/5	0/5	2/5	0/5
L.N. Mes.	3/5	0/5	0/5	2/5	3/5	4/5	2/5	2/5	2/5	1/5	1/5	0/5
L.N. Med.	4/5	1/5	2/5	5/5	2/5	4/5	4/5	3/5	3/5	2/5	3/5	0/5
L.N.S.I.	2/5	1/5	3/5	3/5	4/5	5/5	2/5	4/5	3/5	2/5	2/5	2/5
L.N.S.D.	2/5	1/5	3/5	5/5	4/5	5/5	1/5	4/5	4/5	2/5	3/5	2/5
L.N.I.S.I.	2/5	1/5	2/5	1/5	2/5	4/5	0/5	1/5	1/5	1/5	3/5	1/5
L.N.I.S.D.	3/5	2/5	3/5	1/5	3/5	3/5	0/5	2/5	3/5	1/5	3/5	1/5
L.N. Est.	1/5	2/5	4/5	1/5	2/5	4/5	0/5	1/5	1/5	2/5	3/5	0/5
TOTAL (%)	43.3	26.7	55.0	55.0	60.0	64.4	26.7	40.0	46.7	30.0	50.0	21.7

^a: Número de muestras positivas/número de muestras analizadas

N.L. Mes.: nódulo linfático mesentérico; N.L.Med.: nódulo linfático mediastínico; N.L.S.I.: nódulo linfático submandibular izquierdo; N.L.S.D.: nódulo linfático submandibular derecho; N.L.I.S.I.: nódulo linfático inguinal superficial izquierdo; N.L.I.S.D.: nódulo linfático inguinal superficial derecho; N.L.Est.: nódulo linfático esternal.

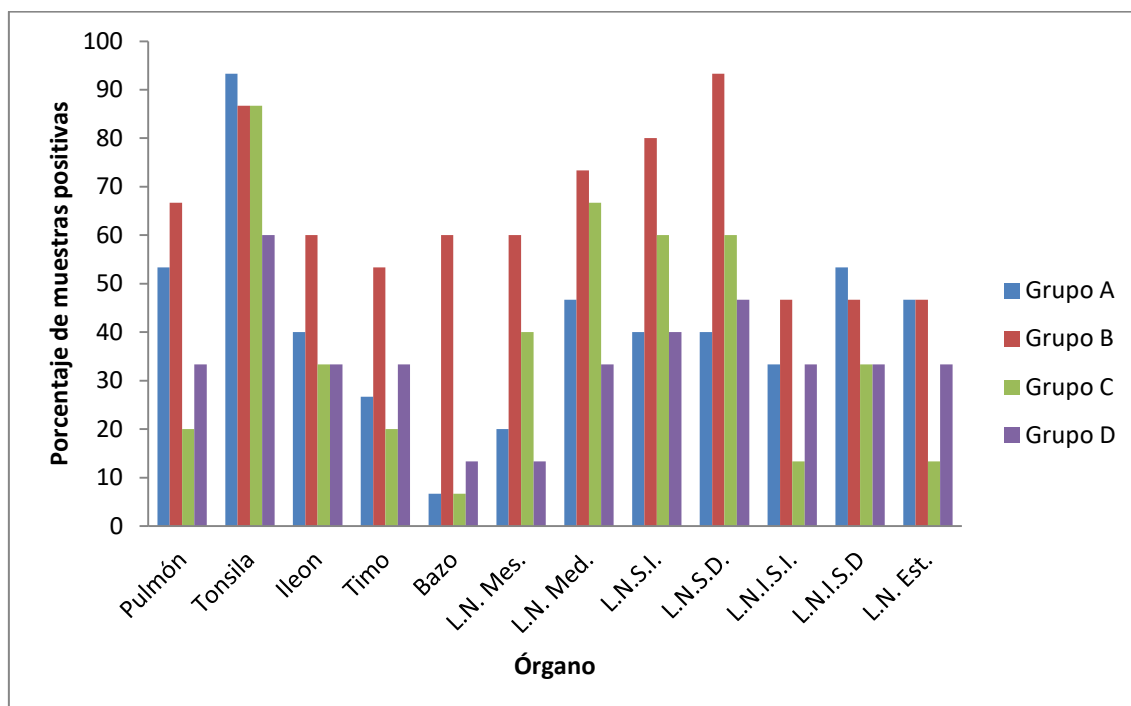
Tabla 13: Frecuencia total de aislamiento del VSRRP en la línea celular MARC-145 a partir de las muestras de los distintos órganos recogidos en la necropsia de los cerdos vacunados de cada grupo experimental.

	Grupo A		Grupo B		Grupo C		Grupo D	
Órganos	Número	%	Número	%	Número	%	Número	%
Pulmón	8/15	53,33	10/15	66,67	3/15	20,00	5/15	33,33
Tonsila	14/15	93,33	13/15	86,67	13/15	86,67	9/15	60,00
Ileon	6/15	40,00	9/15	60,00	5/15	33,33	5/15	33,33
Timo	4/15	26,67	8/15	53,33	3/15	20,00	5/15	33,33
Bazo	1/15	6,67	9/15	60,00	1/15	6,67	2/15	13,33
L.N. Mes.	3/15	20,00	9/15	60,00	6/15	40,00	2/15	13,33
L.N. Med.	7/15	46,67	11/15	73,33	10/15	66,67	5/15	33,33
L.N.S.I.	6/15	40,00	12/15	80,00	9/15	60,00	6/15	40,00
L.N.S.D.	6/15	40,00	14/15	93,33	9/15	60,00	7/15	46,67
L.N.I.S.I.	5/15	33,33	7/15	46,67	2/15	13,33	5/15	33,33
L.N.I.S.D.	8/15	53,33	7/15	46,67	5/15	33,33	5/15	33,33
L.N.Est.	7/15	46,67	7/15	46,67	2/15	13,33	5/15	33,33
TOTAL	75/180	41,67	116/180	64,44	68/180	37,78	61/180	33,89

^a: Número de muestras positivas/ número de muestras testadas

N.L. Mes.: nódulo linfático mesentérico; N.L.Med.: nódulo linfático mediastínico; N.L.S.I.: nódulo linfático submandibular izquierdo; N.L.S.D.: nódulo linfático submandibular derecho; N.L.I.S.I.: nódulo linfático inguinal superficial izquierdo; N.L.I.S.D.: nódulo linfático inguinal superficial derecho; N.L.Est.: nódulo linfático esternal.

Figura 3: Frecuencia aislamiento del VSRRP en la línea celular MARC-145 a partir de las muestras de los distintos órganos recogidos en la necropsia de los cerdos vacunados de cada grupo experimental.



En todas las muestras de tejidos positivas por aislamiento vírico se cuantificó la cantidad del VSRRP presente mediante titulación vírica. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 14, 15, 16 y 17.

Tabla 14: Resultados de la titulación vírica en la línea celular MARC-145 de las muestras de órganos procedentes de los animales del Grupo A.

Semana	Animal	N.L.S.I.	N.L.S.D.	N.L.I.S.I.	N.L.I.S.D.	Timo	Tonsila	Bazo	N.L.Est.	N.L.Med.	N.L.Mes.	Ileon	Pulmón
Primera	1	2,0 ^a	<2,0	4,0	3,6	-	4,2	-	3,5	2,0	<2,0	4,8	-
	2	-	-	-	<2,0	-	3,5	-	-	-	-	4,5	-
	3	<2,0 ^b	-	-	-	-	3,0	-	-	3,0	-	-	-
	4	-	<2,0	<2,0	<2,0	2,0	3,8	-	-	2,5	<2,0	-	-
	5	-	-	-	-	.*	2,5	-	-	<2,0	2,6	<2,0	-
Media± DE ^c		2,0 ± 0,1	1,9 ± 0,0	3,0 ± 1,5	2,5 ± 1,0	2,0 ± NA ^d	3,4 ± 0,7	-	3,5 ± NA	2,4 ± 0,5	2,1 ± 0,4	3,7 ± 1,6	-
Segunda	6	-	-	-	-	-	<2,0	-	<2,0	-	-	-	<2,0
	7	-	-	-	2,0	-	2,5	-	-	<2,0	-	-	<2,0
	8	2,0	2,0	-	2,3	-	2,2	-	2,2	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	<2,0	-	-	<2,0	-	-	-	-	<2,0	<2,0
Media± DE		2,0 ± NA	2,0 ± NA	1,9 ± NA	2,2 ± 0,2	-	2,1 ± 0,3	-	2,1 ± 0,2	1,9 ± NA	-	1,9 ± NA	1,9 ± 0,0
Tercera	11	<2,00	-	-	2	2,4	3,6	-	2,5	<2,0	-	2,0	2,0
	12	-	-	-	-	<2,0	2,4	-	-	2,3	-	-	<2,0
	13	2,0	2,4	2,4	3,6	<2,0	5,2	<2,0	4,5	-	-	4,0	4,3
	14	3,8	4,0	4,0	-	-	5,0	-	<2,0	-	-	-	4,5
	15	-	-	-	<2,0	-	4,6	-	2,6	-	-	-	3,2
Media± DE		2,6 ± 1,1	3,2 ± 1,1	3,2 ± 1,1	2,5 ± 1,0	2,1 ± 0,3	4,2 ± 1,2	1,9 ± NA	2,9 ± 1,1	2,1 ± 0,3	-	3,0 ± 1,4	3,2 ± 1,2

N.L.S.I.: nódulo linfático submandibular izquierdo; N.L.S.D.: nódulo linfático submandibular derecho; N.L.I.S.I.: nódulo linfático inguinal superficial izquierdo; N.L.I.S.D.: nódulo linfático inguinal superficial derecho; N.L.Est.: nódulo linfático esternal; N.L.Med.: nódulo linfático mediastínico; N.L.Mes.: nódulo linfático mesentérico;

^aEl título vírico está expresado en forma de log₁₀ DI₅₀CT/g de tejido

^bPara calcular el título medio a todas las muestras positivas cuyo título estaba por debajo del límite de cuantificación se les ha asignado un valor de 1,9 DI₅₀CT/g de tejido

^cDE: desviación estándar

^dNA: no aplica

Tabla 15: Resultados de la titulación vírica en la línea celular MARC-145 de las muestras de órganos procedentes de los animales del Grupo B.

Semana	Animal	N.L.S.I.	N.L.S.D.	N.L.I.S.I.	N.L.I.S.D.	Timo	Tonsila	Bazo	N.L.Est.	N.L.Med.	N.L.Mes.	Ileon	Pulmón
Primera	21	-	3,0	-	-	-	-	-	-	2,3	-	2,4	2,0
	22	-	<2,0	-	-	-	2,5	-	-	2,0	-	-	-
	23	1,9 ^{a,b}	2,0	-	-	-	2,4	-	-	2,3	-	2,0	-
	24	2,0	<2,0	-	-	<2,0	4,8	<2,0	-	<2,0	4,3	4,6	3,6
	25	3,0	3,0	2,0	2,3	4,6	4,4	2,0	2,3	3,5	2,0	2,0	2,0
Media± DE ^c		2,3 ± 0,6	2,4 ± 0,6	2,0 ± NA ^d	2,3 ± NA	3,3 ± 1,9	3,5 ± 1,3	2,0 ± 0,1	2,3 ± NA	2,4 ± 0,6	3,2 ± 1,6	2,8 ± 1,2	2,5 ± 0,9
Segunda	26	4,2	5,3	3,5	2,3	4,4	5,3	3,6	<2,0	<2,0	-	-	3,8
	27	4,0	3,4	2,3	3,5	3,0	4,1	2,0	-	-	2,3	-	<2,0
	28	2,0	3,1	-	-	-	3,2	-	-	-	2,0	2,3	<2,0
	29	3,5	2,8	-	<2,0	2,0	5,0	2,0	2,2	2,0	2,0	2,5	2,3
	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Media± DE		3,4 ± 1,0	3,7 ± 1,1	2,9 ± 0,8	2,6 ± 0,8	3,1 ± 1,2	4,4 ± 0,9	2,5 ± 0,9	2,1 ± 0,2	2,0 ± 0,1	2,1 ± 0,2	2,4 ± 0,1	2,5 ± 0,9
Tercera	31	4,4	3,2	2,2	4,5	3,0	2,5	2,5	5,0	4,2	2,5	4,6	3,3
	32	2,8	2,6	2,5	2,5	-	4,0	-	2,0	<2,0	-	2,6	-
	33	2,5	<2,0	-	2,5	<2,0	4,5	2,3	2,5	2	<2,0	2,0	2,5
	34	2,5	<2,0	<2,0	-	-	3,0	<2,0	-	-	<2,0	-	-
	35	2,6	2,0	2,3	-	<2,0	3,0	2,0	<2,0	<2,0	<2,0	-	<2,0
Media± DE		3,0 ± 0,8	2,3 ± 0,6	2,2 ± 0,3	3,2 ± 1,2	2,3 ± 0,6	3,4 ± 0,8	2,2 ± 0,3	2,9 ± 1,5	2,5 ± 1,1	2,1 ± 0,3	3,1 ± 1,4	2,6 ± 0,7

N.L.S.I.: nódulo linfático submandibular izquierdo; N.L.S.D.: nódulo linfático submandibular derecho; N.L.I.S.I.: nódulo linfático inguinal superficial izquierdo; N.L.I.S.D.: nódulo linfático inguinal superficial derecho; N.L.Est.: nódulo linfático esternal; N.L.Med.: nódulo linfático mediastínico; N.L.Mes.: nódulo linfático mesentérico;

^aEl título vírico está expresado en forma de log₁₀ DI₅₀CT/g de tejido

^bPara calcular el título medio a todas las muestras positivas cuyo título estaba por debajo del límite de cuantificación se les ha asignado un valor de 1,9 DI₅₀CT/g de tejido

^cDE: desviación estándar

^dNA: no aplica

Tabla 16: Resultados de la titulación vírica en la línea celular MARC-145 de las muestras de órganos procedentes de los animales del Grupo C.

Semana	Animal	N.L.S.I.	N.L.S.D.	N.L.I.S.I.	N.L.I.S.D.	Timo	Tonsila	Bazo	N.L.Est.	N.L.Med.	N.L.Mes.	Ileon	Pulmón
Primera	41	-	-	-	-	<2,0	2,3	-	-	2,0	-	-	-
	42	<2,0 ^{a,b}	-	-	-	-	3,6	-	-	2,3	2,0	-	-
	43	-	<2,0	-	-	-	2,0	-	-	-	-	-	-
	44	-	-	-	-	-	2,0	-	-	2,0	2,0	2,0	-
	45	<2,0	-	-	-	-	-	-	-	<2,0	-	<2,0	-
Media± DE ^c		1,9 ± 0,0	1,9 ± NA ^d	-	-	1,9 ± NA	2,5 ± 0,8	-	-	2,1 ± 0,2	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,1	-
Segunda	46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	47	2,3	2,0	-	-	-	4,3	-	-	2,0	-	-	-
	48	<2,0	2,0	-	-	-	3,8	-	-	-	-	-	-
	49	<2,0	<2,0	-	<2,0	-	4,0	-	2,0	2,0	2,3	-	-
	50	2,0	2,0	2,0	2,6	-	4,8	2,0	-	<2,0	2,0	<2,0	<2,0
Media± DE		2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,1	2,0 ± NA	2,3 ± 0,5	-	4,2 ± 0,4	2,0 ± NA	2,0 ± NA	2,0 ± 0,1	2,2 ± 0,2	1,9 ± NA	1,9 ± NA
Tercera	51	2,5	2,0	2,0	2,5	2,0	2,0	-	-	2	2,6	2,6	2,3
	52	2,0	<2,0	-	-	-	2,6	-	-	2,6	2,5	3,3	-
	53	-	-	-	-	-	2,5	-	-	-	-	-	-
	54	2,0	2,5	-	2	-	4,5	-	2,3	-	-	-	-
	55	-	2,0	-	<2,0	<2,0	3,7	-	-	2	-	-	2,0
Media± DE		2,2 ± 0,3	2,1 ± 0,3	2,0 ± NA	2,1 ± 0,3	2,0 ± 0,1	3,1 ± 1,0	-	2,3 ± NA	2,2 ± 0,3	2,6 ± 0,1	3,0 ± 0,5	2,1 ± 0,2

N.L.S.I.: nódulo linfático submandibular izquierdo; N.L.S.D.: nódulo linfático submandibular derecho; N.L.I.S.I.: nódulo linfático inguinal superficial izquierdo; N.L.I.S.D.: nódulo linfático inguinal superficial derecho; N.L.Est.: nódulo linfático esternal; N.L.Med.: nódulo linfático mediastínico; N.L.Mes.: nódulo linfático mesentérico;

^aEl título vírico está expresado en forma de log₁₀ DI₅₀CT/g de tejido

^bPara calcular el título medio a todas las muestras positivas cuyo título estaba por debajo del límite de cuantificación se les ha asignado un valor de 1,9 DI₅₀CT/g de tejido

^cDE: desviación estándar

^dNA: no aplica

Tabla 17: Resultados de la titulación vírica en la línea celular MARC-145 de las muestras de órganos procedentes de los animales del Grupo D.

Semana	Animal	N.L.S.I.	N.L.S.D.	N.L.I.S.I.	N.L.I.S.D.	Timo	Tonsila	Bazo	N.L.Est.	N.L.Med.	N.L.Mes.	Ileon	Pulmón
Primera	61	2,0 ^a	2,3	-	-	2,0	2,3	-	2,0	<2,0	-	<2,0	-
	62	<2,0 ^b	2,3	2,0	2,5	4,3	2,0	-	2,0	2,8	3,6	3,6	<2,0
	63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	65	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Media ± DE ^c		2,0 ± 0,1	2,3 ± 0,0	2,0 ± NA ^d	2,5 ± NA	3,2 ± 1,6	2,2 ± 0,2	-	2,0 ± 0,0	2,4 ± 0,6	3,6 ± NA	2,8 ± 1,2	1,9 ± NA
Segunda	66	-	2,2	2,0	2,0	2,0	4,8	<2,0	-	2,5	-	-	2,3
	67	<2,0	<2,0	2,0	2,0	2,0	3,0	2,0	2,0	2,3	-	<2,0	2,5
	68	-	2,0	2,0	2,0	-	2,5	-	2,3	<2,0	-	<2,0	-
	69	<2,0	-	-	-	-	3,3	-	-	-	2,0	-	-
	70	-	-	-	-	-	-	-	2,0	-	-	-	-
Media ± DE		1,9 ± 0,0	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	2,0 ± 0,0	3,4 ± 1,0	2,0 ± 0,1	2,1 ± 0,2	2,2 ± 0,3	2,0 ± NA	1,9 ± 0,0	2,4 ± 0,1
Tercera	71	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72	2,0	-	-	2	-	4,6	-	-	-	-	-	2,6
	73	-	<2,0	-	-	-	3,8	-	-	-	-	-	<2,0
	74	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	75	2,6	2,0	2,6	2	2,6	3,8	-	-	-	-	2,0	-
Media ± DE		2,3 ± 0,4	2,0 ± 0,1	2,6 ± NA	2,0 ± 0,0	2,6 ± NA	4,1 ± 0,5	-	-	-	-	2,0 ± NA	2,3 ± 0,5

N.L.S.I.: nódulo linfático submandibular izquierdo; N.L.S.D.: nódulo linfático submandibular derecho; N.L.I.S.I.: nódulo linfático inguinal superficial izquierdo; N.L.I.S.D.: nódulo linfático inguinal superficial derecho; N.L.Est.: nódulo linfático esternal; N.L.Med.: nódulo linfático mediastínico; N.L.Mes.: nódulo linfático mesentérico;

^aEl título vírico está expresado en forma de log₁₀ DI₅₀CT/g de tejido

^bPara calcular el título medio a todas las muestras positivas cuyo título estaba por debajo del límite de cuantificación se les ha asignado un valor de 1,9 DI₅₀CT/g de tejido

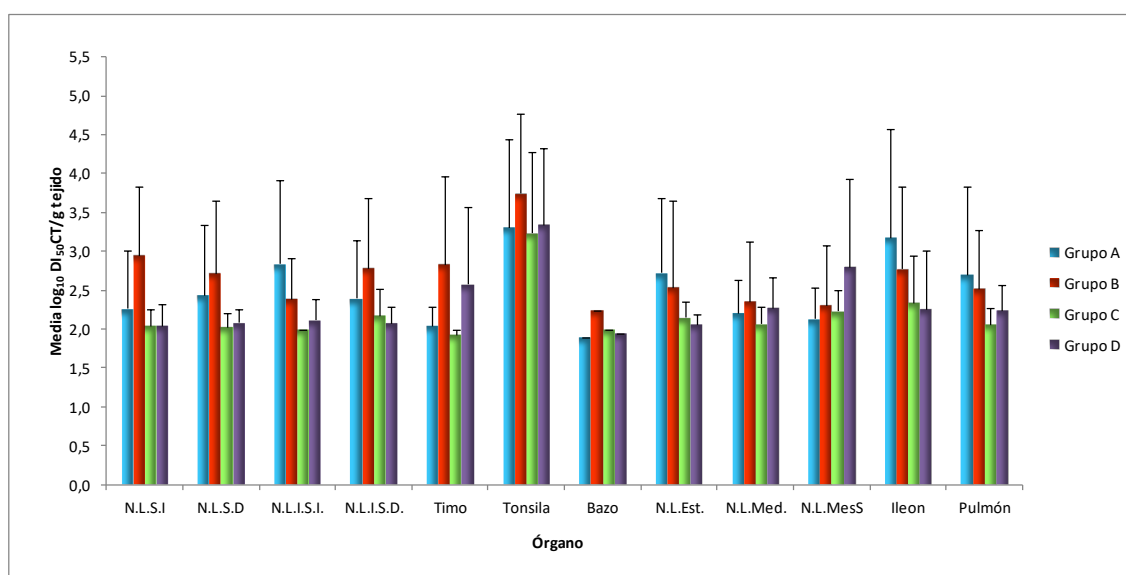
^cDE: desviación estándar

^dNA: no aplica

Cuando se compararon los títulos víricos obtenidos para cada tejido en los distintos días de necropsia, no se observaron diferencias significativas en la cantidad de virus presente en cada localización orgánica, siendo los títulos víricos bastante similares entre los distintos órganos analizados, con la salvedad de las tonsilas, en las que los títulos víricos medios fueron ligeramente superiores a los encontrados en el resto de los órganos, con independencia del grupo estudiado. No obstante, las diferencias observadas entre los títulos víricos obtenidos en las muestras de tonsila y los obtenidos en el resto de órganos analizados no fueron estadísticamente significativas. Los títulos víricos medios obtenidos para cada muestra de tejido tomada en la necropsia en los distintos grupos experimentales se representan en la Figura 4.

Por otra parte, cuando se compararon los títulos víricos medios obtenidos para cada órgano entre los distintos grupos experimentales, no se observó una gran disparidad entre grupos, siendo las diferencias en título generalmente pequeñas y en ningún caso estadísticamente significativas. Finalmente, tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los títulos víricos obtenidos de un mismo tejido en distintos momentos p.v.

Figura 4: Título vírico medio obtenido en la línea celular MARC-145 para los distintos órganos recogidos en la necropsia de los cerdos vacunados de cada grupo experimental.



N.L.S.I.: nódulo linfático submandibular izquierdo; N.L.S.D.: nódulo linfático submandibular derecho; N.L.I.S.I.: nódulo linfático inguinal superficial izquierdo; N.L.I.S.D.: nódulo linfático inguinal superficial derecho; N.L.Est.: nódulo linfático esternal; N.L.Med.: nódulo linfático mediastínico; N.L.Mes.: nódulo linfático mesentérico

A pesar de la amplia distribución orgánica encontrada en los distintos grupos experimentales cuando se realizó el aislamiento vírico en la línea celular estable MARC-145, prácticamente todas las muestras analizadas dieron un resultado negativo cuando se determinó la presencia del virus utilizando cultivos primarios de MAPs. Así, es destacable que todas las muestras procedentes de los animales de los Grupos C y D dieron un resultado negativo, mientras que de las muestras procedentes de los animales de los Grupos A y B, sólo se pudo aislar el VSRRP a partir de un pequeño número. En concreto el virus estuvo presente, en cantidades próximas

al límite de detección de la técnica (2 DI₅₀CT/g de tejido), en las tonsilas de dos animales del Grupo A y cuatro del Grupo B, todas ellas obtenidas en el día 21 p.v.

4.3.3. DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DEL VSRRP MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA EN LAS MUESTRAS DE PULMÓN

Sobre los cortes de pulmón se llevó a cabo una técnica de IHQ para determinar la presencia del virus en esta localización. En ningún corte de pulmón perteneciente a los animales del grupo control se detectó la presencia del antígeno del VSRRP. Los resultados obtenidos aparecen resumidos en la Tabla 18. Como se puede observar en dicha tabla, todas las muestras analizadas procedentes de los Grupos C y D dieron un resultado negativo, así como todas las muestras de los Grupos A y B obtenidas en los días 7 y 14 p.v. Por el contrario, en el día 21 p.v. tres de los cinco animales del Grupo A y dos de los cinco animales del Grupo B resultaron positivos mediante la técnica de IHQ (todas ellas con una puntuación de 1). Cuando el virus se detectó, fue principalmente encontrado en el citoplasma de los macrófagos en el espacio alveolar.

Tabla 18: Número y porcentaje de animales cuyas muestras de pulmón dieron un resultado positivo para la detección del VSRRP mediante la técnica de inmunohistoquímica en los distintos días del experimento.

Día p.v.	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
7	0/5 (0%) ^a	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
14	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
21	3/5 (60%)	2/5 (40%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)

^a:Número de positivos/número total analizado (Porcentaje de positivos)

4.3.4. ELIMINACIÓN DEL VSRRP POR DISTINTAS RUTAS

Como era de esperar, todas las muestras recogidas de los animales del grupo control fueron negativas al aislamiento vírico.

La eliminación del VSRRP por distintas rutas se ha estudiado realizando aislamiento vírico a partir de hisopos nasales, orales y rectales tomados en distintos momentos tras la vacunación. Los resultados de estos estudios aparecen recogidos en la Tabla 19. Igualmente, el porcentaje de muestras positivas para cada uno de los tipos de hisopos por semanas y de forma global para cada grupo experimental está representado en las Figuras 5, 6 y 7. Finalmente, la frecuencia global de aislamiento para cada tipo de hisopo se resume en la Figura 8.

Como se puede observar en dichas figuras, la frecuencia de detección del virus difirió notablemente en función de la vía de eliminación considerada. Así, el virus se detectó únicamente de forma esporádica en las secreciones nasales, en las que el porcentaje de

muestras positivas osciló entre el 2,22% obtenido en los Grupos B y D y el 5,56% registrado en el Grupo A y C. La frecuencia de aislamiento fue ligeramente superior en las secreciones orofaríngeas, oscilando el porcentaje de muestras positivas en los hisopos orales entre el 5,56% del Grupo D y el 7,78% de los Grupos A y C. Finalmente, el virus fue detectado con la misma frecuencia en los hisopos rectales, con un porcentaje de muestras positivas que osciló entre el 3,33% encontrado en el Grupo C y el 6,67% hallado en el Grupo A.

Hay que destacar que no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la eliminación por cada una de ellas entre los grupos experimentales A, B, C y D, siendo el porcentaje de muestras positivas similar en todos los grupos (Figura 8). Finalmente, en lo que se refiere al momento en el que es más probable encontrar el virus en las distintas secreciones, los datos obtenidos muestran cierta variabilidad dependiendo de la muestra y del grupo considerado. Así, en el caso de los hisopos nasales, la mayoría de las muestras positivas se han obtenido en la primera semana p.v. (a partir del día 3 p.v.), con la excepción del Grupo C, en el que la mayoría de muestras positivas fueron tomadas en la segunda semana p.v. (Figura 5). Por el contrario, en los hisopos orales la mayoría de las muestras positivas corresponden a la segunda semana p.v. (desde el día 6 al 15 p.v.) y, en menor medida, a la tercera (Figura 6). Finalmente, la mayoría de muestras positivas en el caso de los hisopos rectales fueron obtenidas en la segunda semana p.v. (Figura 7). Además, se observaron diferencias en la frecuencia y duración en la eliminación del virus que dependieron de la vacuna utilizada. El mayor número de muestras positivas se obtuvo en cerdos del Grupo A (18 en total) que representa el 8% de las muestras tomadas tras la vacunación y el menor número en el Grupo D (11 muestras positivas) significando el 4,89%, permaneciendo en posiciones intermedias los Grupos B y C (12 y 15 muestras positivas, 5,33% y 6,67%, respectivamente). Sin embargo, tampoco en este caso se pudieron determinar diferencias estadísticamente significativas. El título vírico en las muestras positivas no se determinó.

Tabla 19: Frecuencia de aislamiento vírico en la línea celular MARC-145 a partir de los hisopos nasales, orales y rectales tomados a lo largo del experimento de los cerdos vacunados de todos los grupos experimentales.

Días del Experimento	Hisopos Nasales				Hisopos Orales				Hisopos Rectales			
	Grupo				Grupo				Grupo			
	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
0	0/15 ^a	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
3	1/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
6	1/15	0/15	1/15	2/15	2/15	1/15	3/15	1/15	0/15	0/15	0/15	0/15
7	2/5	1/5	1/5	0/5	1/5	1/5	0/5	1/5	2/5	1/5	1/5	1/5
9	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	2/10	1/10	2/10	2/10	1/10	1/10
12	0/10	0/10	2/10	0/10	0/10	0/10	1/10	1/10	0/10	1/10	0/10	1/10
14	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	3/5	1/5	0/5	0/5	0/5	1/5	1/5
15	1/5	0/5	0/5	0/5	2/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
18	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5
21	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	1/5	1/5	0/5	0/5	0/5
Total	5/90	2/90	5/90	2/90	7/90	6/90	7/90	5/90	6/90	4/90	3/90	4/90
Porcentaje	5,56%	2,22%	5.56%	2,22%	7,78%	6,67%	7,78%	5,56%	6.67%	4.44%	3.33%	4.44%

^a:Número de muestras positivas/número de muestras analizadas

Figura 5: Frecuencia de aislamiento del VSRRP a partir de los hisopos nasales obtenidos de los animales vacunados de los distintos grupos experimentales en distintos momentos post-vacunación.

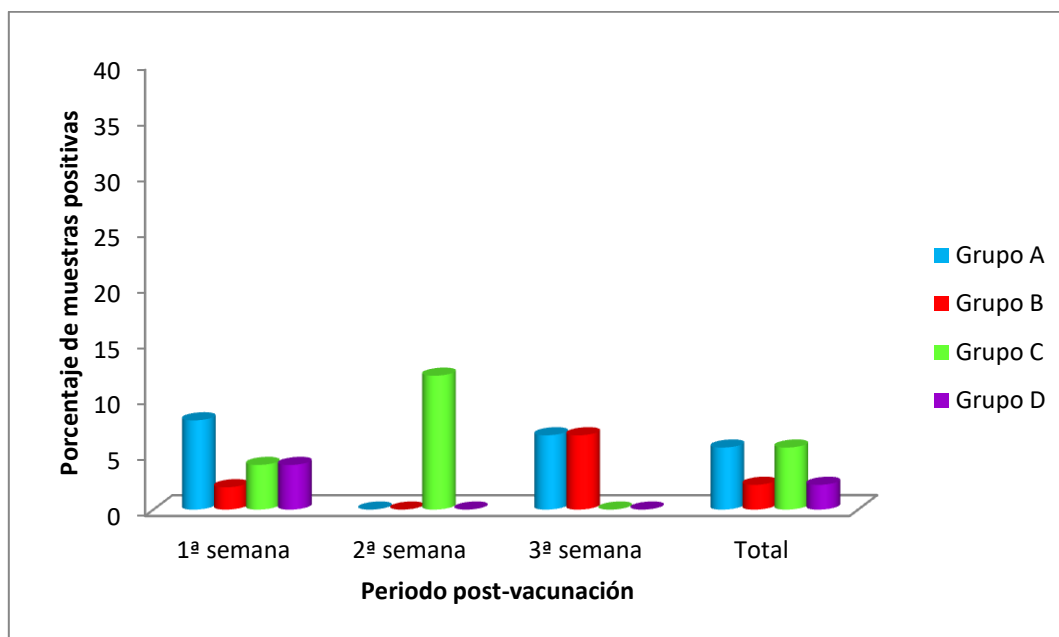


Figura 6: Frecuencia de aislamiento del VSRRP a partir de los hisopos orales obtenidos de los animales vacunados de los distintos grupos experimentales en distintos momentos post-vacunación.

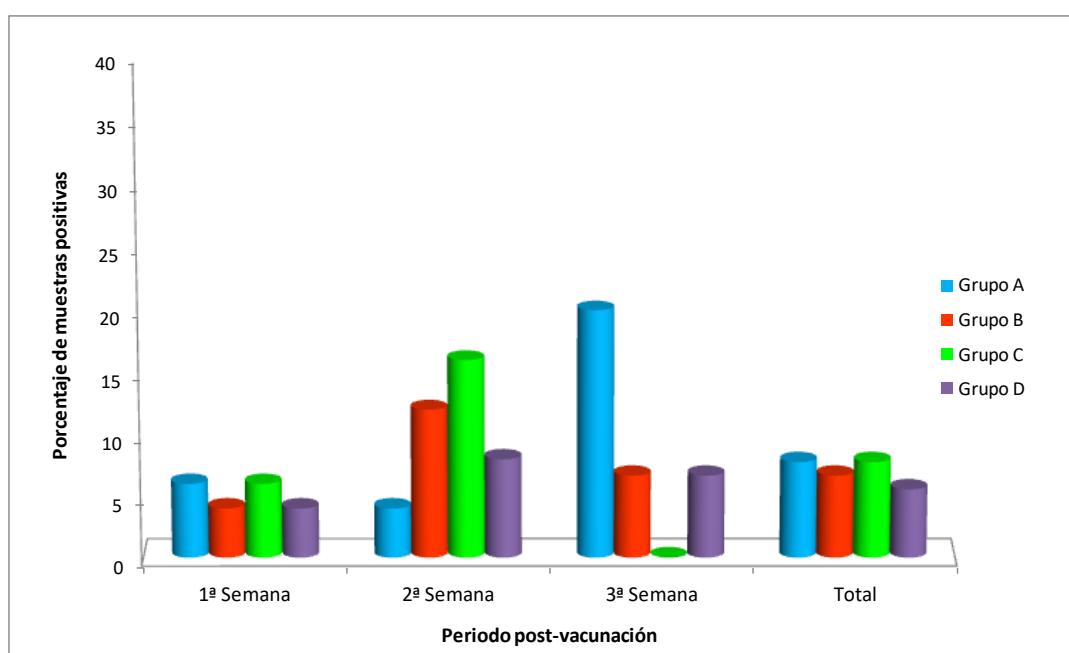


Figura 7: Frecuencia de aislamiento del VSRRP a partir de los hisopos rectales obtenidos de los animales vacunados de los distintos grupos experimentales en distintos momentos post-vacunación.

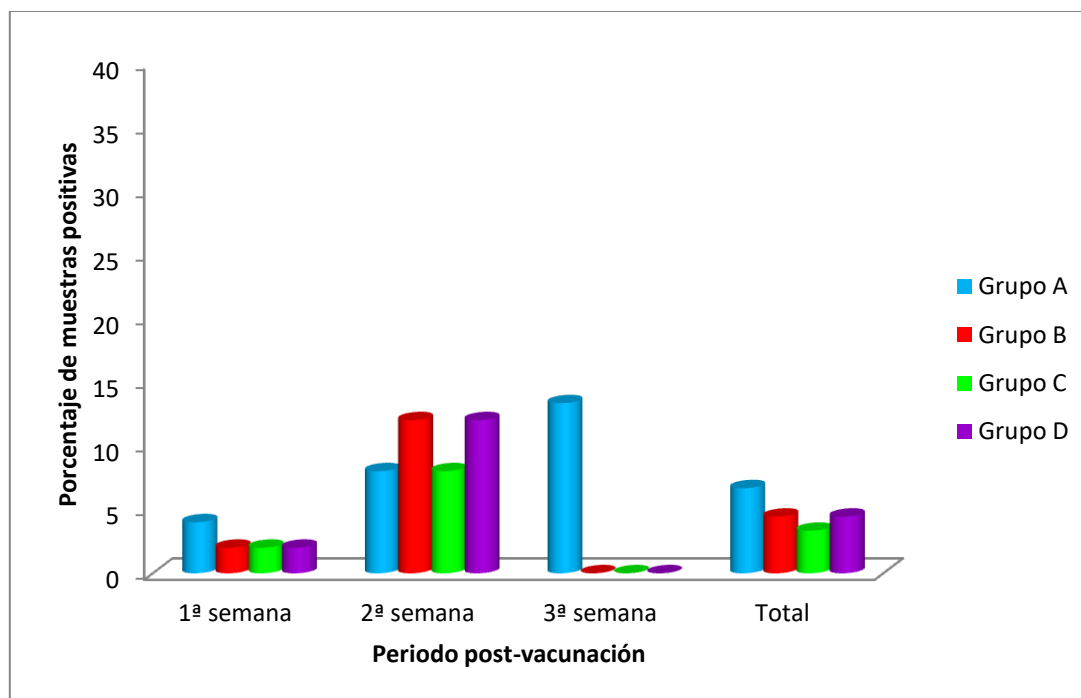
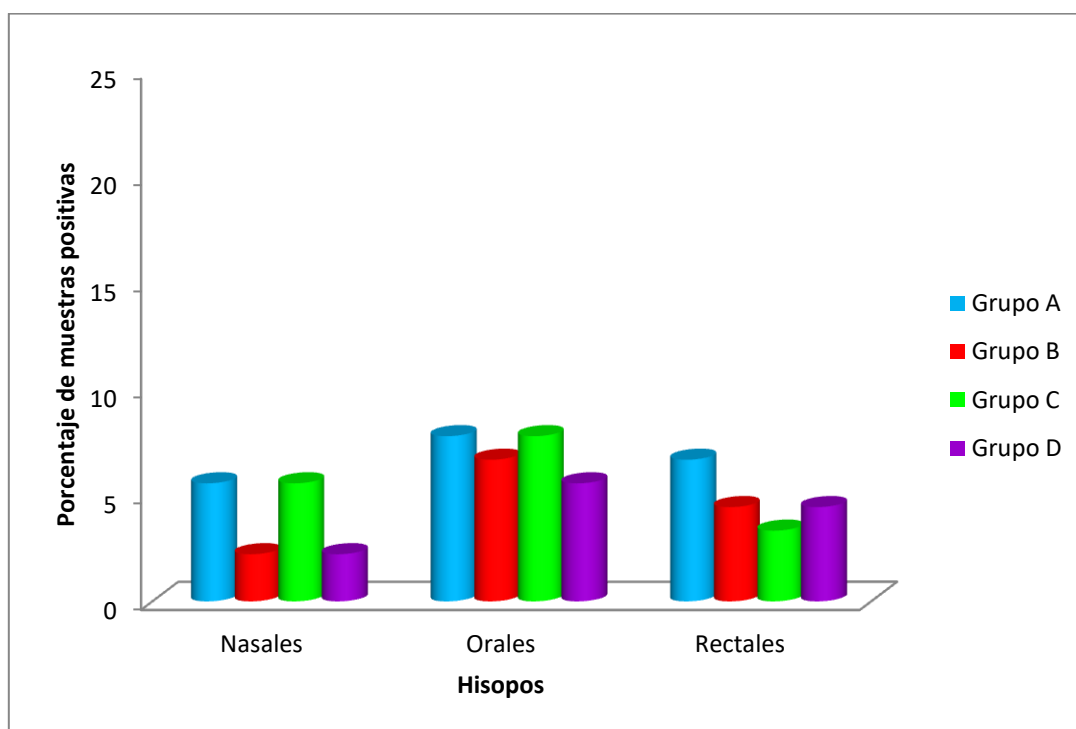


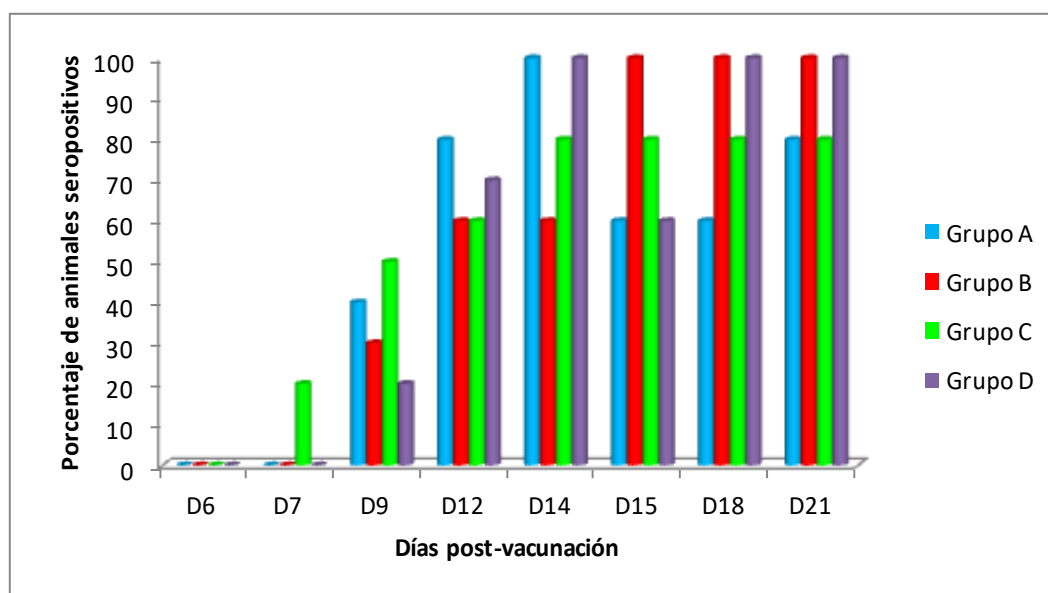
Figura 8: Frecuencia global de aislamiento del VSRRP a partir de los distintos hisopos obtenidos de los animales vacunados de los distintos grupos experimentales.



4.4.SEROCONVERSIÓN

A diferencia de la mayoría de los cerdos vacunados de los grupos experimentales A, B, C y D que desarrollaron anticuerpos específicos frente al VSRRP, detectables mediante la técnica de ELISA, los cerdos del Grupo E o grupo control permanecieron seronegativos a lo largo de todo el período experimental. El porcentaje de cerdos seropositivos encontrado en los Grupos A, B, C y D y en cada uno de los días en los que se analizaron muestras de suero aparece representado en la Figura 9. Como se puede observar en la figura, la seroconversión comenzó a observarse en la mayoría de los grupos en el día 9 p.v. Hasta entonces todos los animales analizados resultaron seronegativos, con la excepción de uno de los animales del Grupo C sacrificado en el día 7 p.v. que mostró una seroconversión temprana. Sin embargo, en el día 9 p.v., cuatro, tres, cinco y dos cerdos de los Grupos A, B, C y D, respectivamente, habían seroconvertido. Posteriormente, el porcentaje de animales seropositivos fue aumentando de forma rápida hasta que al final del experimento, en el día 21 p.v., los cinco animales de los Grupos B y D y cuatro de los cinco animales de los Grupos A y C presentaron anticuerpos específicos frente al virus. A pesar de las pequeñas diferencias observadas en el porcentaje de animales seropositivos en los distintos días del estudio, estas diferencias no fueron nunca estadísticamente significativas.

Figura 9: Porcentaje de animales seropositivos al VSRRP en cada uno de los grupos experimentales a lo largo del estudio.



En los días 7 y 14 post-vacunación se representa el porcentaje de animales seropositivos sacrificados ese día. En el resto de los días se representa el porcentaje de animales seropositivos entre los que quedaban en el estudio (i.e. 15 animales el día 6; 10 animales los días 6 y 12; y 5 animales los días 15, 18 y 21)

4.5. TRANSMISIÓN DEL VSRRP A LOS CERDOS CENTINELA

4.5.1. SÍNTOMAS ASOCIADOS A LA INFECCIÓN DE LOS CERDOS CENTINELA

Todos los cerdos centinela, con independencia del grupo al que pertenecieran, permanecieron sanos y en buenas condiciones durante todo el experimento y no se observó ni fiebre ni ningún otro signo clínico en los mismos.

4.5.2. DETERMINACIÓN DE LA VIREMIA EN CERDOS CENTINELA

Tras el contacto de los animales centinela con los cerdos vacunados, en los grupos experimentales A, B, C y D se produjo la transmisión a alguno de estos cerdos centinela, como lo demuestra la presencia del virus en el suero de algunos de los animales. Los resultados de aislamiento vírico en las muestras de suero procedentes de los animales centinela de los Grupos A, B, C y D se muestran en la Tabla 20 y el porcentaje de muestras positivas para cada grupo en cada uno de los días estudiados aparece representado en la Figura 10.

Como se observa tanto en la Tabla 20 como en la Figura 10, tanto el momento de infección de los centinelas, determinado de forma indirecta en función del momento en que se detectaron virémicos por primera vez, como el número de animales virémicos difirió entre grupos, en algunos casos considerablemente. Así, en el Grupo A, se detectaron cuatro centinelas virémicos por primera vez en el día 9 del estudio y en el día 18 todos los animales centinelas fueron virémicos. En el Grupo B la transmisión se detectó de forma muy temprana ya que uno de los cerdos centinelas fue virémico en el día 6 del experimento. A partir de este momento, el porcentaje de positivos fue aumentando hasta alcanzar un máximo en los días 15 y 18 del experimento, en los que ocho de los nueve animales fueron virémicos. Por el contrario, el número de animales infectados fue mucho menor en los Grupos C y D. En el Grupo C se detectaron dos animales virémicos en el día 9 del estudio (22,2%), manteniéndose estos resultados hasta finalizar el estudio. En el Grupo D cuatro animales fueron virémicos (44,4%), observándose en este grupo una duración menor de la viremia, con un único cerdo centinela virémico en el día 24. Las diferencias en la proporción de centinelas virémicos fueron estadísticamente significativas únicamente en los días 18 y 24 y se establecieron cuando se compararon los resultados del Grupo A con los del Grupo C y con los del Grupo D y también cuando el Grupo B se comparó con el Grupo C en el día 18 ($p < 0,05$).

Cuando el aislamiento vírico a partir de las muestras de suero de los animales centinela se llevó a cabo en cultivos primarios de MAPs, la mayoría de las muestras fueron negativas, obteniéndose resultados positivos únicamente en dos muestras obtenidas de animales del Grupo A en el día 21 del experimento y en una muestra obtenida en el día 18 de un cerdo centinela del Grupo B.

Tabla 20: Resultados de aislamiento vírico en la línea celular MARC-145 a partir de las muestras de suero obtenidas de los animales centinelas de los distintos grupos experimentales a lo largo del experimento.

Días del experimento	Grupo A		Grupo B		Grupo C		Grupo D	
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
D3	0/9 ^a	0,0 ^b	0/9	0,0	0/9	0,0	0/9	0,0
D6	0/9	0,0	1/9	11,1	0/9	0,0	0/9	0,0
D9	4/9	44,4	4/9	44,4	2/9	22,2	1/9	11,1
D12	7/9	77,8	6/9	66,7	2/9	22,2	2/9	22,2
D15	7/9	77,8	8/9	88,9	2/9	22,2	4/9	44,4
D18	9/9	100,0	8/9	88,9	2/9	22,2	4/9	44,4
D24	8/9	88,9	7/9	77,8	2/9	22,2	1/9	11,1

^a: Número de muestras positivas /número total de muestras analizadas

^b: Porcentaje de muestras positivas

Sin embargo, a pesar de las diferencias numéricas, y, ocasionalmente estadísticamente significativas, entre grupos en el número de cerdos centinela virémicos, no se observaron diferencias significativas en los títulos víricos que presentaron los animales virémicos de los distintos grupos experimentales. Los datos de titulación vírica obtenidos a partir de las muestras de suero positivas por aislamiento vírico procedentes de los animales centinela de los Grupos A, B, C y D aparecen reflejados en las Tablas 21, 22, 23 y 24, respectivamente. Por otra parte, en el caso de las muestras positivas para aislamiento vírico en cultivos primarios de MAPs, la cantidad de virus fue muy baja, estando en todos los casos en el límite de detección de la técnica.

Figura 10: Porcentaje de cerdos centinela virémicos en cada uno de los grupos experimentales a lo largo del estudio.

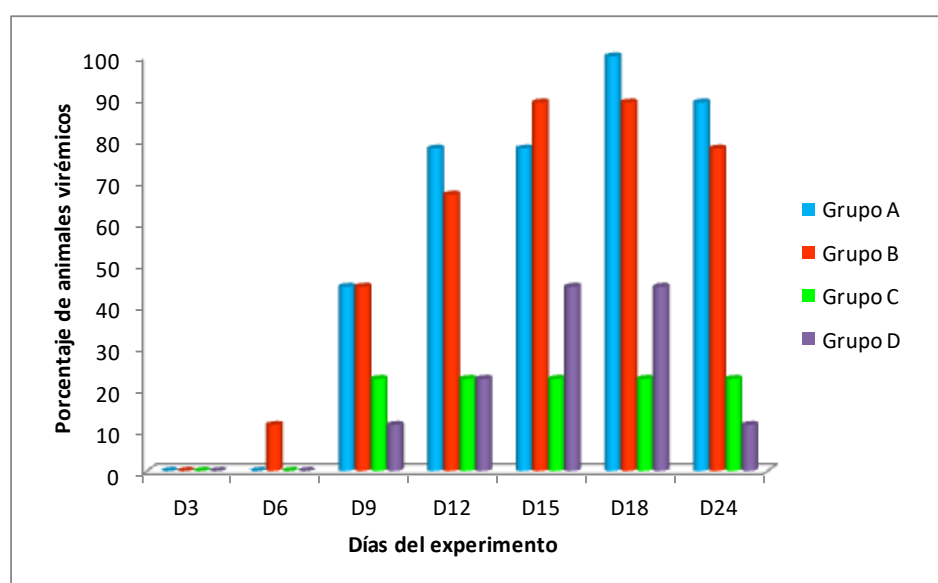


Tabla 21: Resultados de la titulación vírica en la línea celular MARC-145 de las muestras de suero positivas por aislamiento vírico procedentes de los animales centinela del Grupo A.

Número del animal	Días del experimento						
	D3	D6	D9	D12	D15	D18	D24
16	-	-	-	-	-	3,4	4,4
17	-	-	<1,0 ^{a,b}	2,6	3,2	2,3	-
18	-	-	-	-	-	4,5	4,4
19	-	-	-	2,2	1,3	1,5	2,2
20	-	-	-	3,3	1,0	<1,0	3,8
A	-	-	<1,0	2,8	4,0	<1,0	2,6
B	-	-	2,8	3,5	5,0	3,3	3,3
C	-	-	2,5	2,5	3,2	4,2	3,0
D	-	-	-	2,4	3,5	3,0	<1,0
Media ± DE ^c	-	-	1,8 ± 1,0	2,8 ± 0,5	3,0 ± 1,4	2,7 ± 1,3	3,1 ± 1,2

^a:El título vírico está expresado en forma de log₁₀ DI₅₀CT/g de tejido

^b:Para calcular el título medio a todas las muestras positivas cuyo título estaba por debajo del límite de cuantificación se les ha asignado un valor de 0,9

^cDE: desviación estándar

Tabla 22: Resultados de la titulación vírica en la línea celular MARC-145 de las muestras de suero positivas por aislamiento vírico procedentes de los animales centinela del Grupo B.

Número del animal	Días del experimento						
	D3	D6	D9	D12	D15	D18	D24
36	-	-	-	-	-	-	-
37	-	3,6 ^a	2,6	2,5	3,6	4,2	3,6
38	-	-	3,6	4,0	3,2	3,5	<1,0
39	-	-	-	1,0	2,5	1,0	-
40	-	-	2,8	<1,0 ^b	2,0	1,8	1,0
E	-	-	-	3,7	1,5	3,5	2,6
F	-	-	-	-	<1,0	2,8	3,2
G	-	-	-	-	3,3	3,0	3,5
H	-	-	2,7	3,0	2,5	2,3	3,5
Media \pm DE ^c	-	3,6 \pm NA ^d	2,9 \pm 0,5	2,5 \pm 1,3	2,4 \pm 0,9	2,8 \pm 1,0	2,6 \pm 1,2

^a:El título vírico está expresado en forma de \log_{10} DI₅₀CT/g de tejido

^b:Para calcular el título medio a todas las muestras positivas cuyo título estaba por debajo del límite de cuantificación se les ha asignado un valor de 0,9

^cDE: desviación estándar

^dNA: no aplica

Tabla 23: Resultados de la titulación vírica en la línea celular MARC-145 de las muestras de suero positivas por aislamiento vírico procedentes de los animales centinela del Grupo C.

Número del animal	Días del experimento						
	D3	D6	D9	D12	D15	D18	D24
56	-	-	-	-	-	-	-
57	-	-	-	-	-	-	-
58	-	-	-	-	-	-	-
59	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-
I	-	-	3,0 ^a	3,2	2,6	2,6	2,8
J	-	-	-	-	-	-	-
K	-	-	-	-	-	-	-
L	-	-	2,3	2,3	1,5	2,3	3,5
Media \pm DE ^b	-	-	2,7 \pm 0,5	2,8 \pm 0,6	2,1 \pm 0,8	2,5 \pm 0,2	3,2 \pm 0,5

^a:El título vírico está expresado en forma de \log_{10} DI₅₀CT/g de tejido

^bDE: desviación estándar

Tabla 24: Resultados de la titulación vírica en la línea celular MARC-145 de las muestras de suero positivas por aislamiento vírico procedentes de los animales centinela del Grupo D.

Número del animal	Días del experimento						
	D3	D6	D9	D12	D15	D18	D24
76	-	-	-	1,8	2,6	2,6	-
77	-	-	-	-	-	-	-
78	-	-	-	-	-	-	-
79	-	-	-	-	-	-	-
80	-	-	-	-	-	-	-
M		-	-	-	1,7	3,2	1,8
N		-	-	-	-	-	-
O			2,0 ^a	3,5	4,2	3,5	-
P			-	-	1,0	1,0	-
Media \pm DE ^b	-	-	2,0 \pm NA ^c	2,7 \pm 1,2	2,4 \pm 1,4	2,6 \pm 1,1	1,8 \pm NA

^aEl título vírico está expresado en forma de \log_{10} DI₅₀CT/g de tejido

^bDE: desviación estándar

^cNA: no aplica

4.5.3. DETERMINACIÓN DE LA EXCRECIÓN DEL VSRRP POR LOS CERDOS CENTINELA

En los animales centinela también se determinó la eliminación del VSRRP por distintas rutas tomando hisopos nasales, orales y rectales en distintos días del experimento. Los resultados del aislamiento vírico en cultivos de la línea celular estable MARC-145 a partir de dichos hisopos se muestran en la Tabla 25. Asimismo, el porcentaje de hisopos positivos procedentes de los animales centinelas de los distintos grupos experimentales se muestran en las Figuras 11, 12, 13 y 14. Como se puede observar en la Tabla 25 y en las correspondientes figuras, la frecuencia de aislamiento del VSRRP a partir de los distintos hisopos tomados a los animales centinelas fue, en general, baja, existiendo diferencias muy notables entre grupos. Así, en los Grupos C y D el VSRRP se aisló de forma muy esporádica, detectándose sólo un hisopo positivo en cada grupo, que en el caso del Grupo C fue un hisopo oral tomado el día 9 del experimento y en el caso del Grupo D fue un hisopo nasal tomado el día 12. Por el contrario, en el Grupo A se encontraron un total de doce hisopos procedentes de animales centinela positivos por aislamiento vírico. La mayoría de ellos fueron hisopos nasales (un total de seis) obtenidos entre los días 9 y 24 del experimento, seguidos por hisopos orales (cuatro en total) obtenidos en los días 15 y 24 mientras que sólo dos hisopos rectales, ambos obtenidos en el día 18, fueron positivos. Finalmente, el Grupo B estuvo en una situación intermedia ya que seis hisopos, la mayoría de ellos rectales (un total de cuatro), fueron positivos para la presencia del VSRRP, obtenidos todos ellos entre los días 9 y 15 del experimento.

Tabla 25: Frecuencia de aislamiento vírico en la línea celular estable MARC-145 a partir de los hisopos nasales, orales y rectales tomados de los animales centinela de los distintos grupos experimentales a lo largo del estudio.

Dia del experimento	Grupo A			Grupo B			Grupo C			Grupo D		
	H. nasales	H. Orales	H. Rectales	H. nasales	H. Orales	H. Rectales	H. nasales	H. Orales	H. Rectales	H. nasales	H. Orales	H. Rectales
D3	0/9 ^a	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
D6	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
D9	1/9	0/9	0/9	0/9	0/9	1/9	0/9	1/9	0/9	0/9	0/9	0/9
D12	1/9	0/9	0/9	1/9	1/9	2/9	0/9	0/9	0/9	1/9	0/9	0/9
D15	2/9	3/9	0/9	0/9	0/9	1/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
D18	1/9	0/9	2/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
D24	1/9	1/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9

^a:Número de muestras positivas / número total de muestras analizadas

Figura 11: Frecuencia de aislamiento del VSRRP a partir de los distintos hisopos tomados a los animales centinela del Grupo A a lo largo del estudio.

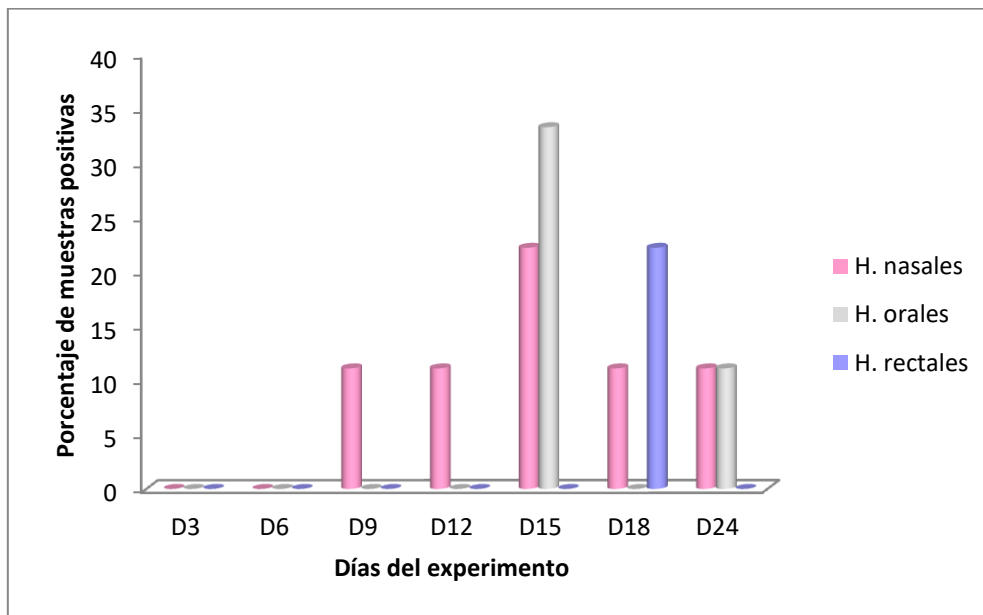


Figura 12: Frecuencia de aislamiento del VSRRP a partir de los distintos hisopos tomados a los animales centinela del Grupo B a lo largo del estudio.

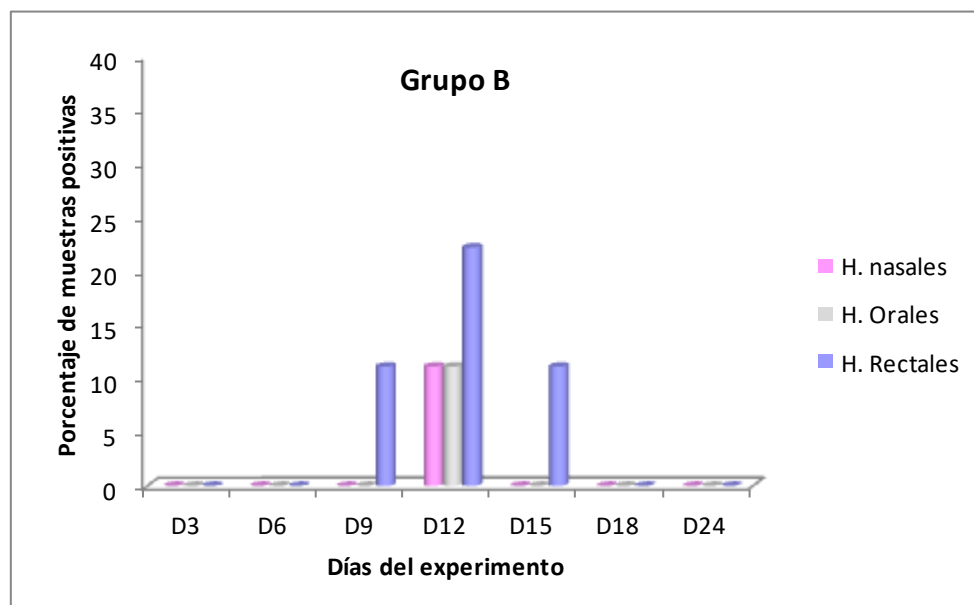


Figura 13: Frecuencia de aislamiento del VSRRP a partir de los distintos hisopos tomados a los animales centinela del Grupo C a lo largo del estudio.

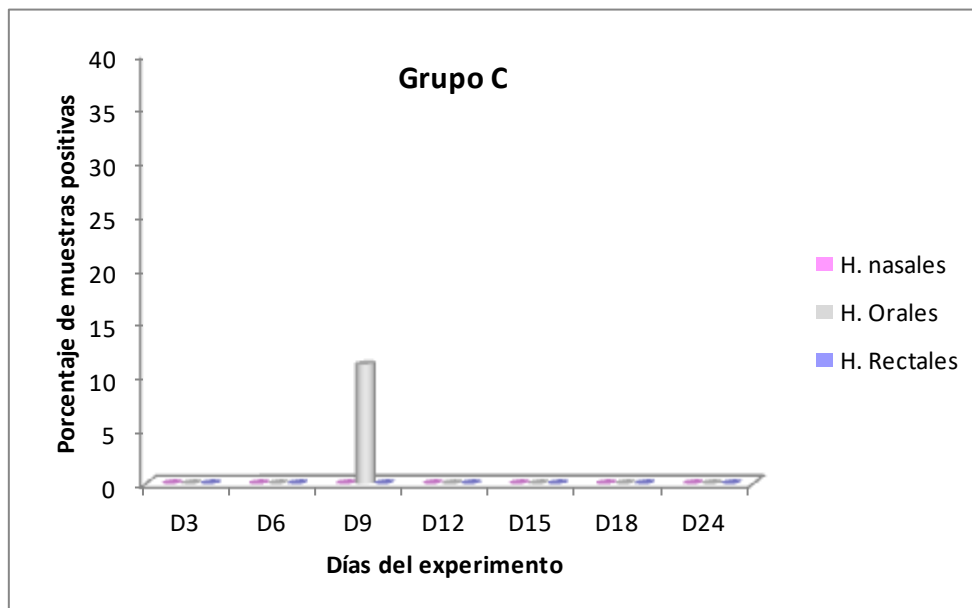
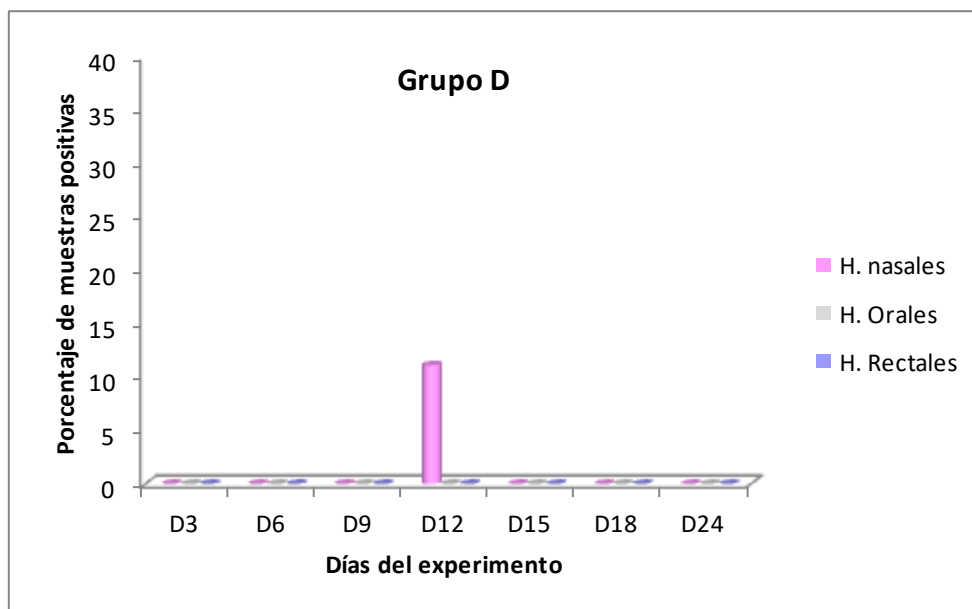


Figura 14: Frecuencia de aislamiento del VSRRP a partir de los distintos hisopos tomados a los animales centinela del Grupo D a lo largo del estudio.



4.5.4. SEROCONVERSIÓN DE LOS CERDOS CENTINELA

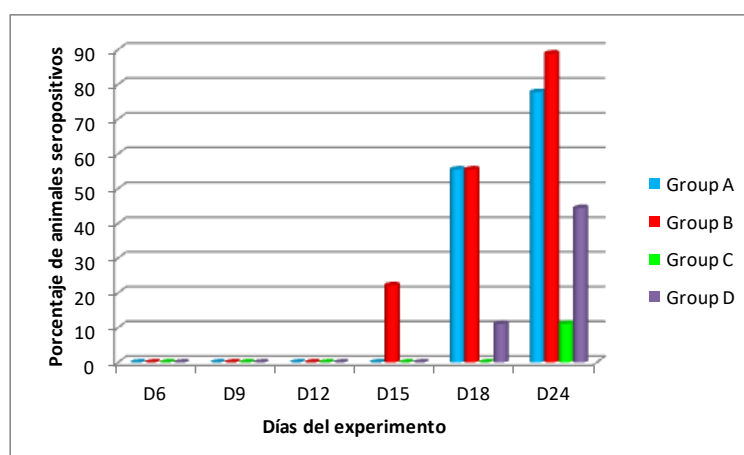
Finalmente, como medida indirecta de la exposición al VSRRP, se determinó la seroconversión en los cerdos centinela de cada uno de los grupos experimentales A, B, C y D. Los resultados obtenidos aparecen resumidos en la Tabla 26 y representados en la Figura 15. Como se observa en dicha figura, en todos los grupos experimentales se observó la seroconversión de alguno de los animales centinela, produciéndose ésta a partir del día 15 del experimento. No obstante, el porcentaje de animales seropositivos encontrado en cada uno de los grupos cada día del estudio difirió significativamente. Así, en el Grupo C solo un animal había seroconvertido al final del estudio, mientras que en el Grupo D se registró un animal seropositivo en el día 18 y cuatro en el día 24. Por el contrario, en los Grupos A y B la mayoría de los animales (siete en el Grupo A y ocho en el Grupo B) fueron seropositivos al final del estudio, detectándose los primeros animales seropositivos en el día 15 en el Grupo B y en el día 18 en el Grupo A. No obstante, a pesar de las diferencias numéricas, sólo hubo diferencias estadísticamente significativas en el día 24 del experimento y, concretamente, entre los Grupos A y C ($p<0,01$) y entre los Grupos B y C ($p<0,003$).

Tabla 26: Número de animales centinela de cada uno de los grupos experimentales seropositivos para el VSRRP en cada uno de los días del estudio.

Día	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
D6	0/9 ^a	0/9	0/9	0/9
D9	0/9	0/9	0/9	0/9
D12	0/9	0/9	0/9	0/9
D15	0/9	2/9	0/9	0/9
D18	5/9	5/9	0/9	1/9
D24	7/9	8/9	1/9	4/9

^a:Número de muestras positivas/ número total de muestras analizadas

Figura 15: Frecuencia de seropositividad en los animales centinela de cada uno de los grupos experimentales a lo largo del estudio.



5. DISCUSIÓN

El SRRP es una de las enfermedades más importantes económicamente de las que afectan al ganado porcino, habiéndose estimado recientemente el coste de la enfermedad en más de 1.000 millones de dólares anuales (National Pork Board, 2012) en Los Estados Unidos de América mientras que en Europa se asume que el coste de un brote oscila entre 59 y 379 €/cerda y el coste de la enfermedad en su forma endémica se mueve en una horquilla de entre 3 y 160 €/cerda (Nieuwenhuis *et al.*, 2012). Su relevancia económica ha impulsado el desarrollo de diversas medidas de control tanto de naturaleza higio-sanitaria como médica, lo que ha dado lugar a la comercialización de diversas vacunas para el control de la enfermedad tanto en los reproductores como en los animales en crecimiento, entre las que se incluyen vacunas inactivadas y vacunas atenuadas. No obstante, dada la falta de eficacia que presentan las vacunas inactivadas (Osorio *et al.*, 1998; Scotti *et al.*, 2006a; Zuckermann *et al.*, 2007), en la actualidad, las vacunas más utilizadas en los programas de control de la enfermedad en todos los países productores de porcino del mundo son las vacunas vivas atenuadas. Así, en Los Estados Unidos de América, tienen registro dos vacunas distintas (Ingelvac® PRRS MLV e Ingelvac® PRRS ATP), ambas comercializadas por Boehringer Ingelheim, que se basan en dos cepas de genotipo 2, ambas aisladas en Los Estados Unidos de América en distintos años tras la aparición de la enfermedad. De ellas, la que tiene un registro más antiguo, denominada Ingelvac® PRRS MLV, está registrada y se comercializa también en distintos países europeos, incluida España. No obstante, en Europa la vacuna más utilizada es la vacuna denominada Porcilis® PRRS, de Laboratorios Intervet (en la actualidad MSD), que tiene registro en un gran número de países europeos y es la vacuna más vendida, en la actualidad, en España. Finalmente, entre las vacunas vivas atenuadas comercializadas se encuentran también dos vacunas desarrolladas y comercializadas por sendos Laboratorios Españoles. Estas vacunas son Amervac® PRRS registrada por los Laboratorios Hipra S.A., con registro en España, sudeste asiático y un número limitado de países europeos, y la vacuna Pyrsvac-183®, registrada únicamente en España por Laboratorios Syva.

Sin embargo, a pesar de la amplia comercialización de los diversos productos desarrollados por diferentes laboratorios, con el tiempo se han despertado sospechas acerca de su seguridad. Estas sospechas derivan tanto de los resultados de estudios llevados a cabo en condiciones experimentales como de indicios procedentes de la aplicación de dichas vacunas en condiciones de campo, aunque hay que destacar que la mayoría de la información disponible procede de estudios realizados con la vacuna viva atenuada comercializada tanto en Los Estados Unidos de América como en distintos países europeos por los Laboratorios Boehringer Ingelheim Ingelvac® PRRS MLV.

De ella se sabe que el virus atenuado se replica en los animales vacunados dando lugar a un proceso de viremia y que es capaz de persistir durante semanas en el organismo de los mismos (Gorcycia *et al.*, 1995, 1997b; Lager y Mengeling, 1997; Mengeling *et al.*, 1996a, 1999a, 2003a; Johnson *et al.*, 2004). Sin embargo, a pesar de esta extensa replicación *in vivo*, las pruebas de seguridad efectuadas en cerdas seronegativas vacunadas en el último tercio de gestación con dosis 10 veces superiores a las recomendadas indican que no se producen alteraciones en la

reproducción (Gorcyca *et al.*, 1997a) y su utilización en lechones no parece acompañarse de ninguna reacción adversa ni de la aparición de síntomas de la enfermedad (Gorcyca *et al.*, 1995; Roof *et al.*, 1999), confirmando la inocuidad del virus atenuado. No obstante, otros estudios cuestionan la seguridad de la aplicación de la vacuna, al menos en reproductores. En este sentido, estudios de campo parecen indicar ciertos efectos adversos cuando la vacuna se aplica por primera vez a cerdas gestantes en condiciones de granja ya que en las cerdas que se encuentran entre el día 60 y 90 de gestación se puede observar un aumento en la tasa de momificados y en las que se encuentran al final de la gestación se produce un incremento en los nacidos muertos (Dewey *et al.*, 1999). Asimismo, su aplicación en verracos se ha asociado, en estudios experimentales, a alteraciones moderadas de la calidad espermática (Christopher-Hennings *et al.*, 1997).

Además, la replicación *in vivo* permite la transmisión vertical del virus atenuado, el cual es capaz de atravesar la barrera placentaria y producir la infección de los fetos en desarrollo (Mengeling *et al.*, 1996a, 1996c). Igualmente, esta abundante replicación parece permitir la eliminación del virus por distintas rutas, incluyendo el semen, en el cual se puede encontrar el virus vacunal durante períodos de tiempo variables (Christopher-Hennings *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 1997). La eliminación del virus por parte de los animales vacunados se ha considerado la causa de que el virus vacunal se transmita a animales susceptibles no vacunados (Bøtner *et al.*, 1997; Mengeling *et al.*, 1998), incluyendo los lechones en lactación que pueden adquirir el virus de su madre (Mengeling *et al.*, 1996a).

La amplia replicación *in vivo* de esta cepa vacunal y su capacidad para infectar a animales no vacunados y replicarse en los mismos representa un riesgo potencial de reversión a virulencia, especialmente teniendo en cuenta la alta tasa de mutación que presenta este virus, que es superior a la de la mayoría de los virus ARN conocidos (Hanada *et al.*, 2005; Prieto *et al.*, 2009). Aunque la reversión a la virulencia de esta cepa nunca se ha demostrado en condiciones experimentales, existen indicios de campo que indican que estos fenómenos se han producido, al menos en alguna ocasión, como lo indica el hecho de que se aislen virus similares a la cepa vacunal de casos clínicos de la enfermedad (Bøtner *et al.*, 1997) y que, experimentalmente, se haya reproducido la enfermedad inoculando tanto cerdas gestantes como cerdos en crecimiento con aislados muy similares genómicamente a la cepa vacunal (Kranker *et al.*, 1998; Nielsen *et al.*, 2002; Mengeling *et al.*, 1999b; Opriessnig *et al.*, 2002).

Los datos existentes para otras vacunas vivas modificadas indican un comportamiento similar al descrito para la vacuna Ingelvac® PRRS MLV. Así, una vacuna que comercializó Schering-Plough Animal Health bajo el nombre de PrimePac PRRS®, basada en una cepa de genotipo 2, produce una viremia detectable después de la vacunación, siendo posible la transmisión del virus vacunal a centinelas puestos en contacto con los animales vacunados (Hesse *et al.*, 1997; Hutchinson *et al.*, 1997) y la eliminación del virus en el semen de verracos vacunados (Hutchinson *et al.*, 1997). En lo que se refiere a las cepas vacunales de genotipo 1, se sabe que la vacuna viva modificada Porcilis® PRRS, desarrollada por Laboratorios Intervet y comercializada en la actualidad por los Laboratorios MSD, produce una viremia detectable en los animales vacunados (Stadejek *et al.*, 1999), como también sucede con las vacunas Amervac® PRRS, de Laboratorios Hipra S.A., y Pyrsvac-183®, de Laboratorios Syva (Scortti *et al.*,

2006a). No obstante, la viremia no se acompaña de la aparición de signos de enfermedad en los animales vacunados, ni siquiera cuando se vacunan cerdas gestantes con cualquiera de las tres vacunas anteriormente mencionadas (Alexopoulos *et al.*, 2005; Scotti *et al.*, 2006a). Es más, aunque se ha podido comprobar que la exposición de cerdas seronegativas a las cepas atenuadas que componen las vacunas Amervac® PRRS y Pysvac-183® en el día 90 de gestación puede dar lugar al nacimiento de lechones infectados *in utero*, esta infección congénita no produce ningún efecto negativo en la viabilidad y desarrollo de estos lechones, algunos de los cuales presentan viremias de corta duración, sin que se produzca la infección de otros componentes de la camada, mientras que otros parecen ser capaces de eliminar el virus vacunal y causar la infección de compañeros de camada en los que no se pudo determinar la existencia de infección transplacentaria en el momento del nacimiento (Scotti *et al.*, 2006a). Finalmente, hay que destacar que tampoco en el caso de las cepas vacunales de genotipo 1 se ha podido demostrar nunca la capacidad de reversión a virulencia, aunque, al igual que sucede con la vacuna Ingelvac® PRRS MLV, existe la sospecha de que algunos aislados de campo podrían derivar de las cepas vacunales que componen las vacunas Porcilis® PRRS y Amervac® PRRS a juzgar por la elevada similitud genómica que comparten con dichas cepas vacunales (Pesch *et al.*, 2005; Prieto *et al.*, 2009).

Sin embargo, todos los estudios anteriormente mencionados están realizados en condiciones experimentales distintas y han sido realizados por grupos de investigación diferentes. Esto hace que los resultados obtenidos en los distintos experimentos sean difícilmente comparables ya que la edad y el estado fisiológico y/o productivo de los animales utilizados son diferentes, así como el diseño experimental seguido en relación con la toma y análisis de muestras y con los parámetros clínicos y virológicos evaluados. Como resultado, en la actualidad resulta imposible determinar si existen diferencias en la seguridad de las distintas vacunas vivas atenuadas existentes en el mercado, a pesar de los diversos trabajos realizados encaminados a conocer la seguridad de las mismas. El objetivo de este estudio ha sido comparar la seguridad de las cuatro vacunas vivas atenuadas que se comercializan en España bajo las mismas condiciones experimentales para determinar si se pueden considerar similares en relación con la seguridad de su aplicación o si, por el contrario, alguna puede considerarse más adecuada que las demás en relación con este parámetro.

Los estudios de seguridad deben determinar la inocuidad de los productos vacunales para los animales a los que van destinados, incluyéndose habitualmente en los dossieres de registro la inocuidad del producto vacunal, aplicado siguiendo las instrucciones del fabricante, la inocuidad de dosis repetidas y la inocuidad de dosis 10 veces superiores a las recomendadas por el fabricante, junto con estudios para determinar la capacidad de transmisión de las cepas vacunales y la inocuidad de los virus recuperados de los animales infectados por contacto. En este estudio se acometió como primer objetivo la determinación de la inocuidad del producto vacunal a la dosis recomendada por el fabricante en el tipo de animal para el que están destinadas las vacunas. Dado que el objetivo de nuestro estudio era comparar las cuatro vacunas disponibles en España y dado que todas ellas están aprobadas para su uso en cerdos en crecimiento pero sólo algunas lo están para su aplicación en cerdas gestantes, el modelo de infección que se eligió fue el cerdo en crecimiento. Por ello, se utilizaron para llevar a cabo el estudio lechones de cuatro semanas de vida, edad a la que típicamente se vacunan los cerdos

tras el destete. Por otro lado, para determinar la seguridad de las distintas cepas vacunales se registraron distintos parámetros, unos clínicos y otros virológicos, que permitieran establecer la inocuidad de la aplicación de la vacuna, la virulencia residual de las cepas atenuadas y su capacidad de replicación *in vivo*.

Entre los parámetros clínicos analizados se encuentran la ausencia de reacciones adversas tras la inoculación, incluyendo reacciones locales en el punto de inoculación y sistémicas; la ausencia de signos clínicos atribuibles a la enfermedad, que serían consecuencia de la virulencia residual de las cepas atenuadas; y la ausencia de lesiones, tanto macroscópicas como microscópicas, compatibles con la infección por el VSRRP, que también indicarían la existencia de virulencia residual en las cepas atenuadas. Igualmente, como indicador del estado sanitario de los animales, se determinaron los pesos de los animales vacunados en distintos momentos del estudio y se calculó la ganancia media diaria de los animales de los distintos grupos experimentales para estudiar si la vacunación con alguna de las cepas atenuadas tenía algún efecto adverso en la capacidad de crecimiento de los animales vacunados.

Para estimar la capacidad de replicación *in vivo* de cada uno de los virus atenuados en el estudio se incluyó el análisis de distintos parámetros virológicos. En primer lugar se comprobó la capacidad de las cepas vacunales para inducir una viremia detectable en los animales vacunados, estimándose también la carga vírica en cada una de las muestras de suero obtenidas, ya que tanto la extensión como la intensidad de la viremia pueden considerarse indicadores de la capacidad de replicación *in vivo*. Asimismo, se determinó la distribución orgánica y la carga vírica en cada uno de los órganos analizados de cada uno de los virus vacunales en los días 7, 14 y 21 post-vacunación, como indicador de su capacidad de diseminación orgánica y de replicación en distintos órganos y tejidos. Finalmente, se estudió la capacidad de eliminación de cada uno de los virus atenuados por las vías más frecuentes de eliminación, que en este virus incluyen las secreciones nasales, la saliva y las heces (Prieto *et al.*, 2004).

En lo que se refiere a la seguridad de aplicación de dosis repetidas, su estudio no se acometió como un objetivo de este trabajo ya que diversos datos previos indican que en el caso del VSRRP la exposición repetida al mismo aislado del virus da lugar a una ausencia de replicación *in vivo* o al menos a una fuerte limitación de la misma (Lager *et al.*, 1997; Prieto *et al.*, 2008) y a una ausencia de signos clínicos asociados a la enfermedad (Lager *et al.*, 1997b), posiblemente como consecuencia de la inmunidad generada en exposiciones anteriores. Aunque este efecto no se ha demostrado que sea extensible a todos los aislados del virus, es muy probable que las cepas vacunales, cuya capacidad de replicación *in vivo* es, al menos en cierta medida, inferior a los aislados de campo, no sean capaces de generar ningún tipo de síntoma o lesión compatible con el SRRP tras la aplicación de dosis repetidas cosa que, al menos con alguna de las vacunas se ha comprobado en estudios previos, en este caso de eficacia, llevados a cabo en nuestro laboratorio (Prieto *et al.*, 2008).

Finalmente, en las pruebas de registro se deben incluir estudios que demuestren la seguridad de la aplicación de dosis 10 veces superiores a la recomendada. Estas pruebas no se

acometieron en este estudio a pesar de que la influencia de la dosis sobre las consecuencias clínicas de la infección no ha sido totalmente esclarecida en el caso del VSRRP. La información disponible no permite establecer una norma universal, aunque los datos parecen indicar que la influencia de la dosis podría depender, al menos en parte, de la virulencia de la cepa que se utilice para desafiar a los animales. Así, en el caso de aislados virulentos del VSRRP algunos estudios demuestran que la inoculación de los animales con dosis altas de virus dan lugar a una sintomatología de mayor gravedad que la inoculación con dosis más bajas, que se asocia con una viremia de mayor duración aunque no con una mayor carga de virus en suero en la fase aguda de la infección (Loving *et al.*, 2008). Por el contrario, la exposición a distintas dosis de aislados de menor virulencia parece no tener un claro efecto en el curso y gravedad de la enfermedad (Johnson *et al.*, 2004), indicando que es poco probable que la dosis tenga un efecto similar en cepas poco virulentas que en aislados muy virulentos. Es más, un estudio llevado a cabo inmunizando lechones con dosis crecientes de una cepa china del VSRRP de alta virulencia atenuada tras pases sucesivos en cultivo celular ha demostrado que no se observan efectos adversos en los animales inmunizados con dosis de entre 10^2 y 10^6 DI₅₀CT (Tian *et al.*, 2009). Finalmente, en estudios previos llevados a cabo en nuestro grupo de investigación en los cuales se han inmunizado animales con cada una de las vacunas utilizadas en el presente estudio se pudo comprobar, aunque con un número muy limitado de animales, que dosis de hasta 100 veces las recomendadas por los fabricantes no producían ningún tipo de sintomatología en los animales inmunizados (datos no publicados). Todo lo anteriormente mencionado parece indicar que es poco probable que dosis altas de cepas atenuadas tengan un efecto negativo o presenten una virulencia superior a la esperada, aunque, en último término, sería necesario comprobarlo experimentalmente.

Por el contrario, sí se ha considerado oportuno estudiar, al menos parcialmente, la capacidad de transmisión de los distintos virus atenuados a animales centinelas puestos en contacto con los animales vacunados ya que diferencias en la capacidad de transmisión *in vivo* de las distintas cepas vacunales se pueden considerar un indicador de la seguridad de la cepa vacunal.

Como ya se ha mencionado, como primer indicador de seguridad se determinó la aparición de signos clínicos en los animales tras la vacunación. La observación de los animales vacunados permitió concluir que la administración intramuscular de las vacunas vivas atenuadas utilizadas en este estudio a lechones de cuatro semanas de vida no da lugar a ninguna reacción adversa, ni de carácter local ni sistémico. Es más, el registro de los signos clínicos, tanto de naturaleza sistémica como respiratoria, así como el registro de la temperatura rectal de los animales vacunados, indicó que las cepas vacunales, a pesar de replicarse extensamente en los animales, no son capaces de producir ningún signo de enfermedad. La ausencia de reacciones adversas y de síntomas asociados al SRRP tras la vacunación se confirmó al analizar los parámetros productivos y, en concreto, la ganancia de peso de los animales a lo largo del estudio, indicador indirecto del estado sanitario de los animales, que se puede considerar similar en todos los grupos estudiados ya que, aunque se observaron pequeñas diferencias entre grupos en función del periodo analizado, las diferencias entre grupos no fueron en ningún caso estadísticamente significativas, considerándose los valores obtenidos normales para animales de esta edad.

La ausencia de signos clínicos en los animales vacunados es coincidente con los resultados obtenidos en otros estudios en los que se han utilizado distintas vacunas vivas atenuadas frente al VSRRP. Así, tanto Opriessnig *et al.* (2002) como Johnson *et al.* (2004) han comunicado que la vacunación de lechones en crecimiento con la vacuna Ingelvac® PRRS MLV no da lugar a ningún signo clínico apreciable, manteniéndose tanto la temperatura rectal como los parámetros respiratorios dentro del rango de normalidad, aunque en ambos casos la exposición de los animales a la cepa vacunal se realizó por vía intranasal en un uso fuera de etiqueta ya que en ningún caso se trata de estudios de seguridad sino de estudios en los que las cepas vacunales se utilizan como cepas de baja virulencia con el fin de compararlas con aislados virulentos del VSRRP. Es más, la exposición a esta misma cepa vacunal por vía intranasal en cerdas gestantes tampoco ha dado lugar a ningún síntoma apreciable sin que se observaran modificaciones en el apetito ni en la temperatura rectal de las cerdas (Mengeling *et al.*, 1996c). Por el contrario, para el resto de las vacunas estudiadas la información disponible es mucho más limitada o incluso ausente, al menos para el modelo utilizado en este estudio. Así, en el caso de la vacuna Porcilis® PRRS se ha indicado que la vacunación de cerdas gestantes no produce ningún signo clínico (Alexopoulos *et al.*, 2005) al igual que la vacunación de lechones, que tampoco produce ninguna reacción adversa (Prieto *et al.*, 2008). Por su parte, la seguridad de las cepas vacunales incluidas en las vacunas Amervac® PRRS y Pysrvac-183® se ha estudiado únicamente en el modelo de cerda gestante, en el cual, a pesar de demostrarse la replicación de ambas cepas y la capacidad de ambas para atravesar la barrera placentaria, no se ha encontrado ninguna reacción adversa tras la exposición a la cepa vacunal, ni en las cerdas ni en los lechones nacidos de las mismas (Scotti *et al.*, 2006). En lechones, la única información disponible procede de un estudio realizado con anterioridad en nuestro grupo de investigación en el cual se administraron las vacunas Ingelvac® PRRS MLV, Amervac® PRRS y Porcilis® PRRS por vía intranasal a lechones de tres semanas de vida, con la misma base genética y la misma sanidad que los animales utilizados en este estudio, con el propósito de comparar la virulencia de distintos aislados de campo con la de cepas del VSRRP con virulencia conocida, como son las cepas vacunales (Martínez-Lobo *et al.*, 2011a). Los resultados de este estudio previo son comparables, en términos clínicos, con los obtenidos en el presente estudio ya que, en ningún caso, la exposición de lechones a las cepas vacunales, anteriormente mencionadas, dio lugar a la aparición de ningún signo clínico ni ninguna reacción adversa (Martínez-Lobo *et al.*, 2007). En su conjunto, nuestros resultados indican que la seguridad, en término clínicos, de las cuatro vacunas analizadas en este estudio es elevada, existiendo una gran garantía de seguridad en su aplicación.

Asimismo, en este estudio se analizó la capacidad de las distintas cepas vacunales para inducir lesión pulmonar tanto macroscópica como microscópica. Una de las principales acciones patógenas del VSRRP en cerdos en crecimiento es la inducción de lesiones pulmonares, cuya gravedad se ha asociado con frecuencia a la virulencia de la cepa (Halbur *et al.*, 1996b). Por tanto, la atenuación de las cepas vacunales debería ir acompañada de una disminución en su capacidad para inducir una lesión pulmonar significativa. Para comprobar este extremo se realizaron sacrificios seriados de los animales vacunados en los días 7, 14 y 21 post-vacunación. Para ello, el día del sacrificio se llevó a cabo una necropsia completa de cada uno de los animales, se registró la presencia de cualquier lesión macroscópica reseñable y se

tomaron muestras para realizar un estudio anatomopatológico que permitiera determinar la presencia de lesiones microscópicas en el pulmón. El estudio macroscópico reveló que ninguno de los animales vacunados presentaba lesiones apreciables en ningún órgano, con la salvedad del pulmón, en el que en algunos animales se observaron pequeñas áreas de consolidación difusas. La evaluación de la lesiones se realizó estableciendo el porcentaje de superficie pulmonar afectada y, posteriormente, se calculó el porcentaje medio de superficie pulmonar afectada en cada grupo cada uno de los días de sacrificio. Este sistema fue desarrollado originalmente por Halbur *et al.* (1996b) para comparar la patogenicidad de distintos aislados del VSRRP y ha sido aplicado posteriormente en diversos estudios, tanto para la comparación de la patogenicidad de distintos aislados como para determinar el grado de protección conferido por una inmunización previa (Opriessnig *et al.*, 2002; Mengeling *et al.*, 2003a). Además, tiene la ventaja de que permite establecer comparaciones bastante fiables entre distintos estudios. Nuestros resultados muestran que la extensión de la lesión pulmonar inducida por las cepas vacunales es muy limitada, oscilando el porcentaje medio de superficie pulmonar afectada entre el 0%, registrado para la vacuna Pyrsvac-183® en los días 14 y 21 p.v. y para la vacuna Porcilis® PRRS en el día 21 p.v. y el 2,4%, registrado en el día 7 p.v. en el grupo expuesto a la vacuna Pyrsvac-183®. Esta prácticamente ausencia de lesión explica la ausencia de signos clínicos de naturaleza respiratoria en los animales vacunados a lo largo del estudio ya que las alteraciones producidas en el pulmón no fueron en ningún caso suficientes para causar ningún síntoma reseñable y son comparables a los resultados obtenidos en otros estudios. Así, en un estudio llevado a cabo por Opriessnig *et al.* (2002) en el que se comparó la patogenicidad de la cepa incluida en la vacuna Ingelvac® PRRS MLV con la de otros aislados de campo se observó en el día 10 p.i. que el porcentaje medio de superficie pulmonar afectada era del 0,9% mientras que en día 28 p.i. este porcentaje ascendía al 4,2%. Porcentajes similares de superficie pulmonar afectada se encontraron en un estudio realizado por nuestro grupo de investigación inoculando por vía intranasal lechones de tres semanas de vida con las cepas vacunales que son base de las vacunas Ingelvac® PRRS MLV, PrimePac® PRRS, Amervac® PRRS y Porcilis® PRRS (Martínez-Lobo *et al.*, 2011a). En este caso, el porcentaje medio de superficie pulmonar afectada no difirió significativamente entre grupos, oscilando entre un mínimo de un 0% registrado en el día 14 p.i. para la vacuna PrimePac® PRRS y un 3,6% registrado para esta misma vacuna en el día 21 p.i.

Aunque no existen diferencias significativas en el porcentaje de superficie pulmonar afectada entre los distintos grupos experimentales a lo largo del estudio, es destacable que mientras la extensión de la lesión pulmonar disminuyó en los grupos expuestos a cepas vacunales de genotipo 1 desde el día 7 p.v. hasta el día 21 p.v., momento en el que terminó el estudio, en el grupo expuesto a la única cepa vacunal de genotipo 2 estudiada, el porcentaje de superficie pulmonar afectada aumentó ligeramente a lo largo del tiempo. Este mismo efecto se ha observado en el estudio realizado por Opriessnig *et al.* (2002) no sólo con esta misma cepa vacunal sino con dos cepas de campo supuestamente derivadas de la misma y, también, en un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación exponiendo a lechones en crecimiento a distintas cepas vacunales por la vía intranasal, en el cual las dos cepas vacunales de genotipo 2 analizadas indujeron una lesión pulmonar cuya extensión se mantuvo o aumentó con el tiempo (Martínez-Lobo *et al.*, 2011a). Aunque no conocemos las causas últimas de este fenómeno, el efecto podría deberse a una combinación del genotipo al que

pertenecen las cepas vacunales y el proceso de atenuación. Así, en estudios previos se ha demostrado que aislados de campo del VSRRP de genotipo 1 tienden a producir una lesión pulmonar macroscópica moderada que alcanza su máxima extensión, normalmente, en la primera semana p.i. y ocasionalmente en la segunda, mientras que los aislados de genotipo 2 tienden a producir una lesión pulmonar de mayor magnitud cuya extensión máxima se alcanza un poco más tarde y se mantiene un poco más en el tiempo (Martínez-Lobo *et al.*, 2011a). Este hecho podría explicar, al menos parcialmente, que la extensión de la lesión pulmonar sea ligeramente superior en la única vacuna de genotipo 2 incluida en el estudio y que su gravedad aumente ligeramente con el tiempo, hecho al que también podría contribuir el proceso de atenuación de la cepa, que podría dificultar su replicación *in vivo* en los macrófagos alveolares limitando así el potencial de la cepa para inducir lesión pulmonar. No obstante, el bajo número de animales analizado cada día del estudio (cinco lechones por grupo), unido a la elevada variabilidad individual descrita en la gravedad de la lesión pulmonar inducida por el VSRRP (Martínez-Lobo *et al.*, 2011a) podría hacer que las diferencias sean fruto únicamente del azar, sin que los datos de los que disponemos nos permitan establecer ninguna conclusión firme, a pesar de la coincidencia de resultados con los obtenidos en otros estudios realizados tanto por nuestro grupo de investigación como por otros.

La leve afectación que mostraron los pulmones cuando se evaluó la extensión de la lesión macroscópica inducida por el virus tuvo su reflejo en la frecuencia y gravedad de la neumonía intersticial observada en esos mismos pulmones. Así, el porcentaje de animales que presentaron lesiones microscópicas osciló entre el 6,7% y el 46,7%, perteneciendo los primeros al Grupo C, expuesto a la vacuna Pyrsvac-183®, y los segundos al Grupo B, expuesto a la vacuna Amervac®PRRS, y en cuanto a la gravedad de dichas lesiones se clasificó de leve o moderada, oscilando la puntuación media obtenida por los distintos grupos experimentales en los diferentes días de estudio entre 0 y 1,6 en una escala de 0 a 4. No obstante, y a pesar de la gravedad moderada de la lesión microscópica observada en los pulmones de los animales expuestos a las distintas cepas vacunales, existieron diferencias estadísticamente significativas entre grupos, aunque sólo en el día 21 p.v., tanto en la frecuencia como en la gravedad de la lesión observada, entre los Grupos A y B, expuestos a las cepas vacunales Ingelvac® PRRS MLV y Amervac® PRRS, y el Grupo C, expuesto a la cepa Pyrsvac-183®, siendo más frecuentes y graves las lesiones en los dos primeros grupos y poco frecuentes y leves en el tercero, estando el Grupo D en una situación intermedia. La menor incidencia y gravedad de neumonía intersticial observada en los Grupos C y, en menor medida, D, se corresponde con un menor porcentaje de superficie pulmonar afectada en estos mismos grupos. Este hecho era esperable ya que ha sido descrito, previamente, por otros autores que han determinado la gravedad de la lesión pulmonar tanto macroscópica como microscópica inducida por aislados del VSRRP tanto de genotipo 2 (Halbur *et al.*, 1996b; Opriessnig *et al.*, 2002; Martínez-Lobo *et al.*, 2011a) como de genotipo 1 (Halbur *et al.*, 1996b; Martínez-Lobo *et al.*, 2011a). Sin embargo, y a pesar de la tendencia a que existiera una correspondencia entre la gravedad de la lesión macroscópica y microscópica, hay que destacar el hecho de que, en la mayoría de los casos, el porcentaje mayor de superficie pulmonar afectada se observó en el día 7 p.v., seguido del día 14 p.v., mientras que la mayor gravedad de neumonía intersticial se observó sistemáticamente en todos los grupos en el día 21 p.v. Esta persistencia en las lesiones microscópicas cuando las lesiones macroscópicas son moderadas o se han resuelto se ha observado con anterioridad en

otros estudios que han determinado la virulencia de distintos aislados del VSRRP en el modelo respiratorio y parece ser una característica de este virus (Halbur *et al.*, 1996b; Martínez-Lobo *et al.*, 2011a).

Teniendo en consideración todos los parámetros analizados se puede concluir que todas las cepas vacunales estudiadas presentan una elevada seguridad en términos clínicos ya que ninguna de ellas fue capaz de inducir ninguna reacción adversa ni síntomas compatibles con el SRRP, aunque fueran moderados, ya que en los animales vacunados no se observó ni siquiera un aumento en la temperatura rectal, signo observado frecuentemente tras la vacunación frente a otros patógenos, entre los que se incluyen el virus de la gripe o el virus de la fiebre amarilla (Forrest *et al.*, 2011; Nasveld *et al.*, 2010). El único efecto negativo que se puede atribuir a los virus del SRRP atenuados es la capacidad para inducir en algunos de los animales vacunados una lesión pulmonar leve caracterizada por la aparición de áreas de consolidación difusa que afectan a una proporción muy pequeña de la superficie pulmonar y que no producen ningún tipo de alteración en la frecuencia o capacidad respiratoria de los animales. Esta alteración macroscópica se corresponde microscópicamente con áreas de neumonía intersticial de gravedad leve o moderada. En este parámetro, al contrario de lo que sucede con el resto de parámetros clínicos, sí se han observado algunas diferencias entre las cepas vacunales estudiadas, aunque estas diferencias son moderadas y circunscritas a las fases más tardías tras la vacunación y se caracterizan por la aparición de lesiones microscópicas más frecuentes y graves en animales expuestos a la cepas vacunales Ingelvac® PRRS MLV y Amervac® PRRS.

No obstante, y a pesar de las lesiones de leves a moderadas observadas en el pulmón de los animales vacunados, las vacunas se pueden considerar más seguras que muchas de las vacunas vivas atenuadas comercializadas para la prevención de otras enfermedades, las cuales con frecuencia dan lugar a signos clínicos característicos de la enfermedad que producen los aislados virulentos, aunque más moderados. Es el caso de las vacunas vivas atenuadas frente al virus de la gripe que pueden inducir fiebre, disminución del apetito, letargia, dolores musculares y síntomas respiratorios moderados como descarga y congestión nasal y dolor de garganta en los pacientes vacunados (De Villiers *et al.*, 2009; Forrest *et al.*, 2011); vacunas vivas atenuadas frente al virus de la fiebre amarilla, que pueden producir fiebre, fatiga, dolor de cabeza y malestar general de gravedad variable y, en casos excepcionales, mareos, mialgias, síncope, pérdida de sensibilidad e incluso encefalitis (Nasveld *et al.*, 2010); e incluso se han descrito casos de poliomiелitis asociados a la vacunación con vacunas orales frente al virus de la poliomiелitis, aunque en una pequeña proporción de individuos vacunados (entre 0,05 y 0,99/ millón en el caso del tipo 1; entre 0 y 0,65/ millón en el caso del tipo 2 y entre 1,18 y 8,91/millón en el caso del tipo 3) (Cáceres y Sutter, 2001). La aparición de efectos adversos o reacciones secundarias se tolera, en ocasiones, ya que el beneficio que se espera que produzca la vacunación, al permitir limitar o anular la difusión de ciertos patógenos especialmente relevantes para la salud pública, es mayor que los riesgos que conlleva su aplicación. En el caso de vacunas animales también se acepta cierto riesgo cuando el beneficio esperado así lo aconseja. Así, por ejemplo, en el caso de la enfermedad de Gumboro existen vacunas inactivadas y vacunas vivas atenuadas de “virulencia moderada” que, a pesar de ser muy seguras, presentan una pobre eficacia cuando se vacuna en presencia de anticuerpos

maternales. Por esta razón se prefiere el uso de vacunas de virulencia “intermedia” o “elevada” que dan lugar a una protección más eficaz de los pollitos vacunados en presencia de anticuerpos maternos, aun cuando este tipo de vacunas inducen lesiones de moderadas a graves en la bolsa de Fabricio (Bublott *et al.*, 2007).

En el caso de las vacunas frente al VSRRP parece que los efectos adversos o las reacciones secundarias no son factores que haya que tener en cuenta a la hora de decidir si se procede a la vacunación de un colectivo. No obstante, hay que tener en cuenta que el presente estudio se ha realizado en animales en crecimiento, en los cuales típicamente la sintomatología asociada a la infección es moderada o incluso nula, especialmente cuando los animales son expuestos a aislados del virus de genotipo 1 (Halbur *et al.*, 1995b; Martínez-Lobo *et al.*, 2011a) y no se puede hacer extensiva a otros modelos, especialmente al modelo de cerda gestante, en la cual la patogenia de la enfermedad es muy distinta y requeriría de un diseño experimental específico para demostrar la seguridad de cada una de las cepas estudiadas.

A pesar de la ausencia de síntomas observada, los virus vacunales son capaces de replicarse extensamente en los animales. En nuestro estudio determinamos la presencia de los virus vacunales en muestras de suero, tomadas cada tres días, para estudiar la dinámica de la infección y el curso de la viremia, y en muestras de distintos órganos, fundamentalmente del sistema linforreticular, recogidos en la necropsia de los animales. La presencia de virus se llevó a cabo en todos los casos por aislamiento vírico ya que en una prueba de seguridad consideramos fundamental determinar la cantidad de virus viable que contenía cada una de las muestras analizadas. No obstante, la determinación de la presencia de virus viable presentaba, en primer lugar, el problema de dirimir en qué soporte celular se debía llevar a cabo la determinación para conseguir la mayor sensibilidad posible. Por un lado, hay que tener en cuenta que la principal célula diana del virus *in vivo* es el macrófago alveolar (Duan *et al.*, 1997), razón por la cual el aislamiento del virus se ha llevado a cabo con éxito, fundamentalmente, en cultivos primarios de MAPs (Wensvoort *et al.*, 1991; De Abin *et al.*, 2009), siendo este tipo celular el más utilizado en la determinación de la presencia del virus en muestras biológicas, al menos en el caso de los aislados de genotipo 1 por la elevada sensibilidad que se consigue (Prieto *et al.*, 1997b; Scotti *et al.*, 2007; Martínez-Lobo *et al.*, 2011a). Pero, por otro lado, hay que tener en consideración que la atenuación de las cepas vacunales se ha llevado a cabo, en todos los casos, mediante pases seriados en cultivos de líneas celulares estables permisibles a la infección por el VSRRP, típicamente MARC-145 (Kim *et al.*, 1993). Este hecho hace previsible que, por un proceso de selección positiva, los virus vacunales tengan una elevada capacidad de replicación en estas líneas celulares y, probablemente, hayan perdido, al menos en parte, su capacidad de replicación en cultivos primarios de MAPs, como ha sucedido con frecuencia con otros virus que se han atenuado mediante la adaptación a líneas celulares procedentes de especies distintas a las que infecta de forma natural. En el caso del VSRRP, no existen muchos datos acerca de la capacidad de las distintas cepas vacunales de replicarse en cada uno de los tipos celulares descritos, por lo que en nuestro estudio decidimos utilizar tanto cultivos de la línea celular estable MARC-145 como cultivos primarios de MAPs para determinar la presencia del virus en las distintas muestras biológicas obtenidas.

Cuando se utilizaron cultivos de la línea celular estable MARC-145 para determinar la dinámica de la infección y la distribución de virus en los distintos tejidos, se pudo constatar que todas las cepas vacunales son capaces de replicarse extensamente en el organismo de los animales vacunados, dando lugar a una viremia fácilmente detectable y prolongada como lo demuestra el hecho de que una elevada proporción de animales de todos los grupos experimentales estuvieran todavía virémicos al finalizar el estudio en el día 21 p.v. Estos resultados no eran inesperados ya que, aunque la información disponible para las distintas cepas vacunales es muy variable, está ampliamente reconocido que los virus vacunales se replican extensamente en los animales vacunados. En concreto, se ha demostrado que la cepa vacunal Ingelvac® PRRS MLV produce viremias que son prolongadas en lechones (Gorcyca *et al.*, 1995, 1997b; Mengeling *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2004) y algo más cortas en animales adultos (Mengeling *et al.*, 1996a, 1999a; Christopher-Hennings *et al.*, 1997). Por el contrario, en lo que se refiere a las cepas vacunales de genotipo 1 la información disponible es menos abundante. Así, en el caso de Porcilis® PRRS se ha demostrado que la vacunación de animales en crecimiento produce una viremia fácilmente detectable (Stadejek *et al.*, 1999; Prieto *et al.*, 2008), sin que existan datos en animales adultos, mientras que la vacuna Amervac® PRRS produce viremias más prolongadas en lechones (Álvarez *et al.*, 2006;) y más cortas en animales adultos (Scortti *et al.*, 2006a). Finalmente, en el caso de la vacuna Pyrsvac-183®, sólo se sabe que es capaz de inducir una viremia de corta duración en cerdas gestantes (Scortti *et al.*, 2006a).

Sin embargo, hasta la fecha no se ha llevado a cabo ningún estudio en el que se haya realizado un estudio comparativo de la capacidad de replicación de todas las cepas vacunales disponibles en el mercado bajo las mismas condiciones experimentales, única manera de determinar la existencia de diferencias, si es que las hay, en su capacidad de replicación en el hospedador natural, el cerdo.

Los resultados de nuestro estudio confirman que todas las cepas vacunales producen viremias detectables por aislamiento vírico en cultivos de la línea celular estable MARC-145 cuando se vacunan lechones en crecimiento por la vía intramuscular. Sin embargo, la dinámica de dicha viremia es ligeramente diferente dependiendo de la cepa vacunal considerada. Las cepas vacunales Ingelvac® PRRS y Amervac® PRRS producen viremias detectables al menos desde el día 3 p.v., mostrando una dinámica de infección similar a la que se observa con los aislados de campo (Prieto *et al.*, 2008; Martínez-Lobo *et al.*, 2011a). Por el contrario, en los animales expuestos a las cepas vacunales Pyrsvac-183® y Porcilis® PRRS se observó un retraso en el establecimiento de la viremia, pudiéndose determinar la presencia del virus en muestras de suero procedentes de los mismos únicamente a partir del día 6 p.v. Estas diferencias entre grupos en la frecuencia de aislamiento del virus a partir de muestras de suero fueron estadísticamente significativas en el día 3 p.v.

Además, aunque las diferencias, en este caso, no fueron estadísticamente significativas, hay que destacar que la proporción de animales virémicos fue distinta entre los distintos grupos experimentales, siendo generalmente inferior en los Grupos C y D, y especialmente en este último, que en los Grupos A y B, con independencia del momento p.v. estudiado. Así, considerando los resultados globales, se puede decir que prácticamente todos los animales del Grupo A fueron virémicos desde el comienzo al final del estudio, con un 96% de las muestras

de suero positivas, y que la inmensa mayoría de los animales del Grupo B también lo fueron, con un 88% de muestras positivas. Sin embargo, el porcentaje de muestras de suero positivas por aislamiento vírico fue de tan solo el 64% en el Grupo C y del 57,33% en el Grupo D. En estos resultados tiene un peso específico importante el hecho de que en los Grupos C y D no se aislara virus en el día 3 p.v., momento en el que había 15 animales/grupo en el estudio. No obstante, si se consideran únicamente los datos desde el día 6 p.v. hasta el final del estudio el porcentaje de animales positivos sigue la misma tendencia, aunque las diferencias entre grupos son mucho menores, con un porcentaje de muestras positivas del 100% en el Grupo A, el 86,67% en el Grupo B, el 80% en el Grupo C y el 71,67% en el Grupo D.

Asimismo, cuando se considera la distribución orgánica del virus tras la vacunación también se observan diferencias importantes entre grupos. Sin embargo, en este caso son los animales del Grupo B, vacunados con la vacuna Amervac® PRRS, los que presentan una distribución orgánica muy superior a la del resto de los grupos, con un 64,44% de muestras positivas. Las diferencias en la frecuencia de aislamiento a partir de muestras orgánicas entre este grupo y los demás son tan marcadas que tienen significación estadística. Por el contrario, la frecuencia de aislamiento a partir de las muestras de tejidos obtenidas de los animales del resto de los grupos fue muy similar, oscilando entre el 41,67% de muestras positivas en el Grupo A y el 33,89% en el Grupo D. En relación con la distribución temporal de muestras orgánicas positivas, el análisis semanal de resultados no permite establecer un patrón claro, aunque en tres de los cuatro grupos (A, B y C) la frecuencia más alta de aislamiento se obtiene en el último día del estudio, especialmente en el caso de los Grupos A y B, mientras que sólo se observa una tendencia a la disminución en el número de muestras positivas al final del estudio en el Grupo D, vacunado con la vacuna Porcilis® PRRS. Estos datos indican que el virus es capaz de replicarse en distintos tejidos durante periodos relativamente largos de tiempo y, aunque la duración del estudio no permite establecer conclusiones a este respecto, es posible que los virus vacunales persistan en algunos órganos incluso después de la desaparición de la viremia.

Por otra parte, cuando la frecuencia de aislamiento del virus se analizó órgano a órgano en los distintos grupos experimentales, tampoco se pudieron establecer diferencias significativas entre grupos, ni siquiera entre el Grupo B y el resto de los grupos, con la única excepción de las muestras de bazo, en las que la frecuencia de aislamiento fue estadísticamente superior en animales del Grupo B comparativamente con el resto de grupos y las muestras de nódulos linfáticos mesentéricos en las que se pudo determinar una frecuencia de aislamiento estadísticamente superior en el Grupo B que en el Grupo D. En el resto de los órganos analizados, se puede considerar que la distribución fue similar en todos los grupos.

Por el contrario, la frecuencia de aislamiento difirió entre los distintos órganos recogidos en la necropsia, con independencia del grupo considerado. Así, el VSRRP se aisló con mayor frecuencia en muestras de tonsila, seguido de los nódulos linfáticos submandibulares y mediastínicos, mientras que el órgano del que se aisló el VSRRP con menor frecuencia fue el bazo. Estos resultados son, en términos generales, similares a los obtenidos en estudios previos realizados inoculando tanto cerdos adultos como lechones en crecimiento con aislados de campo del VSRRP ya que todos los estudios apuntan a que el órgano donde se puede aislar el VSRRP con mayor probabilidad es la tonsila, seguido de ciertos nódulos linfáticos, entre los

que destacan los submandibulares, mientras que la frecuencia de aislamiento a partir de muestras de bazo es relativamente baja (Prieto *et al.*, 2004; Martínez-Lobo *et al.*, 2011a). Es más, el tropismo tisular del virus parece mantenerse entre aislados de genotipo 1 y de genotipo 2 que presentan frecuencias de aislamiento similares en distintos órganos analizados (Martínez-Lobo *et al.*, 2011a).

La comparación de la distribución orgánica de las cepas vacunales y de los aislados de campo tras la infección parece indicar que el proceso de atenuación de las cepas no altera significativamente el tropismo tisular de las mismas, con la notable excepción del pulmón. En este órgano, al menos durante las tres primeras semanas p.i., el porcentaje de muestras positivas está muy próximo al 100% cuando los animales se infectan con aislados de campo, tanto de genotipo 1 como de genotipo 2 (Prieto *et al.*, 2004; Martínez-Lobo *et al.*, 2011a). Sin embargo, en nuestro estudio el porcentaje de muestras de pulmón positivas osciló entre el 66,67% obtenido en el Grupo B y el 20% obtenido en el Grupo C, a pesar de tratarse de infecciones agudas. Esta pobre capacidad de replicación de las cepas vacunales en el pulmón es especialmente marcado en el caso de las cepas Pyrsvac-183® y Porcilis® PRRS ya que únicamente un 20% de las muestras de pulmón procedentes de los animales vacunados con la cepa Pyrsvac-183® y un 33,33% de las procedentes de animales vacunados con la cepa Porcilis® PRRS fueron positivas por aislamiento vírico. Por el contrario, la pérdida de tropismo por este órgano fue mucho menos marcado en el caso de la cepa Ingelvac® PRRS, que se pudo aislar de un 53,33% de las muestras de pulmón obtenidas y de la cepa Amervac® PRRS que se recuperó de un 66,67% de las muestras analizadas. Es más, cuando se analiza la distribución temporal del virus en muestras de pulmón se puede observar que, con la excepción del Grupo B, expuesto a la cepa vacunal Amervac® PRRS, la frecuencia de aislamiento en pulmón tiende a aumentar con el tiempo, en lugar de disminuir, que sería lo esperable *a priori*, como se ha demostrado en estudios previos en animales infectados con aislados de campo (Prieto *et al.*, 2004). Esta tendencia se confirmó analizando la presencia del virus en cortes histológicos de pulmón mediante la técnica de inmunohistoquímica ya que sólo fue posible determinar la presencia directa del virus en el pulmón en muestras obtenidas en el día 21 p.v. y, únicamente, en animales vacunados con las cepas Ingelvac® PRRS y Amervac® PRRS, a pesar de la menor sensibilidad que se reconoce que tiene esta técnica en comparación con el aislamiento vírico (Halbur *et al.*, 1996a; Martínez-Lobo *et al.*, 2011a).

Estos datos apuntan a la posibilidad de que los virus vacunales, durante su proceso de atenuación, pierdan, al menos en parte, su tropismo por el pulmón, lo que justificaría que la frecuencia de aislamiento del virus en esta localización sea sensiblemente inferior a la que se produce cuando los animales se infectan con aislados de campo e indican que la pérdida de tropismo parece ser mucho más acusada en el caso de las cepas Pyrsvac-183® y Porcilis® PRRS. En relación con el tropismo celular del VSRP, se sabe que sus células diana son células presentadoras de antígeno, incluyendo macrófagos, monocitos y células de la línea dendrítica, siendo los macrófagos alveolares y los macrófagos intravasculares las células susceptibles mejor caracterizadas (Duan *et al.*, 1997; Lawson *et al.*, 1997). De hecho, el pulmón es uno de los primeros lugares de replicación vírica tras la infección intranasal, habiéndose detectado antígeno vírico en esta localización a partir de las 12 horas p.i. en distintos tipos celulares pero sobre todo en macrófagos alveolares y, en menor medida, intersticiales e intravasculares

(Rossow *et al.*, 1996), células que parecen sustentar la replicación normal del virus en el pulmón. El hecho de que las cepas vacunales tengan una pobre capacidad de replicación en el pulmón de los animales vacunados, sin que se vea tan disminuida su capacidad para replicarse en otros órganos, parece indicar que, durante los procesos de atenuación mediante pases seriados en cultivos celulares, los virus vacunales pueden haber perdido, al menos en parte, su capacidad de replicación en los tipos celulares que constituyen su célula diana en el pulmón y, especialmente, los macrófagos alveolares.

Esta disminución en la capacidad de replicación de las cepas vacunales en los macrófagos alveolares se ha podido constatar cuando se ha intentado el aislamiento del virus a partir de las muestras biológicas obtenidas en el estudio en cultivos primarios de MAPs. Los resultados obtenidos permiten llamar la atención acerca de la diferencia que existe tanto en la frecuencia de aislamiento vírico como en la carga vírica presente en cada muestra entre el empleo de cultivos celulares de la línea celular estable MARC-145 y el empleo de cultivos primarios de MAPs. Así, cuando se analizan las muestras de suero, se observa que la inmensa mayoría son positivas por aislamiento vírico cuando se utilizaron cultivos de la línea celular MARC-145 mientras que sólo ocho lo fueron cuando se emplearon cultivos primarios de MAPs. Estas ocho muestras positivas se obtuvieron de animales de dos de los grupos experimentales (Grupo A y Grupo B) y todas a partir del día 12 p.v. Una situación similar se observó cuando se analizaron las muestras de tejidos recogidas en la necropsia. Como ya se ha comentado, cuando se emplearon cultivos de la línea celular MARC-145 una cantidad importante de las muestras de distintos órganos procedentes de animales de todos los grupos experimentales fueron positivas por aislamiento vírico. Sin embargo, sólo seis muestras, todas ellas de tonsila y obtenidas el día 21 p.v., fueron positivas para aislamiento vírico cuando se utilizaron cultivos primarios de MAPs. Es más, también en este caso todas las muestras procedían de animales de los Grupos A y B.

Todos los resultados, anteriormente presentados, indican que las distintas cepas vacunales difieren de forma significativa en su capacidad de replicación en distintos tipos celulares, y, específicamente, en los macrófagos alveolares. Así, los intentos de aislamiento de las cepas vacunales *in vitro*, en cultivos primarios de MAPs, a partir de muestras biológicas obtenidas de los animales expuestos a las cepas vacunales Pyrsvac-183® y Porcilis® PRRS indican que ninguna de estas cepas vacunales se replica en este tipo celular ya que muchas de las muestras que dieron un resultado negativo en cultivos de MAPs contenían virus, como lo demuestra el aislamiento exitoso en la línea celular MARC-145. Esta incapacidad para replicarse en los MAPs explicaría también por qué estas dos cepas vacunales se aíslan de los pulmones de los animales vacunados con una frecuencia inferior a la que se obtiene con las otras dos cepas vacunales y la incapacidad para detectar muestras positivas en corte de pulmón mediante la técnica de inmunohistoquímica. Por el contrario, las cepas vacunales Ingelvac® PRRS MLV y Amervac® PRRS conservan, al menos en parte, su capacidad de replicación en la principal célula diana del virus, como lo demuestra el aislamiento de los virus vacunales a partir de algunas de las muestras biológicas obtenidas en el estudio en cultivos primarios de MAPs y la mayor presencia de ambas cepas vacunales en los pulmones de los animales vacunados. No obstante, hay que destacar que, incluso en estos casos, únicamente una pequeña proporción de las muestras positivas contienen virus capaz de replicarse en MAPs, siendo especialmente

destacable el hecho de que todas las muestras en las que se ha podido determinar la presencia de virus con capacidad de replicación de cultivos primarios de MAPs se obtuvieron a partir del día 12 p.v. y, especialmente, en la tercera semana p.v. Aunque desconocemos a qué se debe este hecho, se podría especular que el grado de atenuación de las cepas vacunales Pyrsvac-183® y Porcilis® PRRS podría ser superior al de las cepas Ingelvac® PRRS y Amervac® PRRS. Ello haría que las dos primeras cepas hubieran perdido completamente su capacidad de replicación en MAPs, replicándose *in vivo* exclusivamente en otros tipos celulares susceptibles a la infección, mientras que las dos últimas podrían contener una población de virus más heterogénea en la que algunos virus retuvieran su capacidad de replicación en MAPs. Estos virus, minoritarios al comienzo de la infección, podrían progresivamente ganar peso en el transcurso de la misma por una ventaja competitiva en su capacidad de replicación, lo que se traduciría en la obtención de muestras que contuvieran una población de virus capaz de infectar MAPs suficiente para estar por encima del límite de detección de la técnica de aislamiento vírico en cultivos primarios de MAPs y producir efecto citopático. Además, esta población con capacidad de replicación en MAPs tendría una mayor presencia en el pulmón, permitiendo así la detección de virus en un mayor número de muestras de este órgano y también la detección directa de macrófagos infectados sobre cortes de tejido.

Estas diferencias en la capacidad de replicación en distintos tipos celulares entre las distintas cepas vacunales podrían explicar también el retraso en el comienzo de la viremia observado en los animales expuestos a las cepas Pyrsvac-183® y Porcilis® PRRS. En este sentido, hay que tener presente que las vacunas se aplican por la vía intramuscular, lo que implica que el virus tiene que ser transportado, posiblemente por células presentadoras de antígeno, hasta los lugares en los que existan células susceptibles a la infección, presumiblemente órganos linfoides. Las limitaciones en la capacidad de replicación en MAPs de algunas de las cepas vacunales estudiadas podrían ser extensivas a otros tipos celulares susceptibles a la infección, lo que podría conducir a una mayor dificultad de las cepas Pyrsvac-183® y Porcilis® PRRS para alcanzar poblaciones celulares que permitan su replicación y establecer la infección. De hecho, la frecuencia global de aislamiento vírico a partir de las distintas muestras orgánicas obtenidas en los distintos grupos experimentales parece indicar que la replicación de estas dos cepas vacunales es menos eficiente que la de Ingelvac® PRRS y Amervac® PRRS, y especialmente de esta última.

Por otro lado, es posible que las diferencias en la capacidad de replicación en macrófagos alveolares de las distintas cepas vacunales guarde relación no solo con la mayor capacidad de replicación en el pulmón de las cepas Ingelvac® PRRS y Amervac® PRRS sino también con las pequeñas diferencias observadas en la extensión de la lesión pulmonar. De hecho, se sabe que la patogenia de la enfermedad respiratoria se debe, fundamentalmente, al efecto del virus sobre los MAPs. Tras la infección por aislados de campo del VSRRP se produce una destrucción de MAPs en los animales infectados, principalmente, durante la primera semana p.i., que conduce a la desaparición de entre el 50 y el 65% de los mismos (Molitor *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 1992; Molitor, 1993). Además, los MAPs infectados presentan una alteración de su actividad antimicrobiana inespecífica consistente en una alteración de su capacidad de liberación del ión superóxido, una supresión del NADPH y una disminución de la actividad fagocítica y, por tanto, de aclaramiento de partículas (Molitor, 1993; Thanawongnuwech *et al.*,

1998; De Baere *et al.*, 2012). Todo ello compromete un importante componente de la respuesta inmune pulmonar, favoreciendo infecciones secundarias, al menos de forma transitoria (Molitor, 1993). Además, la infección por el VSRRP induce un aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias, especialmente IL-1, que, junto con la destrucción de los macrófagos infectados, mediarán fenómenos inflamatorios en el pulmón que llevarán a la aparición de células inflamatorias y restos de células necróticas en la luz alveolar (Van Reeth *et al.*, 2000), lo que hace que la proporción de MAPs en los lavados bronco-alveolares pase de en torno al 95% que se observa en condiciones fisiológicas a no más del 50% en los primeros momentos tras la infección. Por último, es conocido que la infección por el VSRRP causa la muerte por apoptosis en las células afectadas y también en células cercanas no infectadas (Súarez *et al.*, 1996a; Shin *et al.*, 1997; Labarque *et al.*, 2003b; Lee y Kleiboeker, 2007). Tanto los procesos de apoptosis como la liberación de citoquinas por los macrófagos infectados parecen jugar un papel relevante en la patogenia de la enfermedad respiratoria y, específicamente, en la aparición de las lesiones observadas en los animales afectados (Sirinarumitr *et al.*, 1998; Labarque *et al.*, 2003b). Por tanto, el hecho de que algunas de las cepas vacunales sean capaces de replicarse en MAPs, aunque probablemente de forma limitada, podría causar alguna alteración en la funcionalidad de los mismos que conduzca a la liberación de citoquinas que medien fenómenos inflamatorios así como la muerte de una proporción de los mismos, lo que a su vez también causaría la infiltración de células inflamatorias en el pulmón para eliminar los restos necróticos de las células muertas. Por el contrario, la incapacidad para replicarse en los MAPs de las cepas vacunales Pysrvac-183® y Porcilis® PRRS podría contribuir a preservar su funcionalidad y evitaría las alteraciones, por moderadas que sean, derivadas de la infección de los mismos. Sin embargo, deberían llevarse a cabo estudios específicos con el fin de demostrar si la atenuación y sus efectos consecuentes en la replicación orgánica de los virus vacunales tienen alguna influencia en el desarrollo de una respuesta inmune específica dado que, desde nuestro conocimiento, no existe información disponible acerca de este tema. No obstante, en la mayoría de los estudios llevados a cabo para determinar la protección conferida por las distintas vacunas vivas atenuadas frente al VSRRP, se observa, principalmente, una protección parcial ante el desafío de cerdos vacunados con distintos aislados del VSRRP (Prieto *et al.*, 2008; Scotti *et al.*, 2006b; Lager *et al.*, 1999), lo cual no difiere significativamente de la protección cruzada esperada entre distintos aislados de campo del virus (Lager *et al.*, 1999). Por tanto, la replicación alterada de los virus vacunales en el hospedador parece no relacionarse claramente con la inducción de una respuesta inmune pobre y de protección limitada, si bien la variabilidad del VSRRP jugaría un papel más importante en la falta de una protección completa entre los distintos aislados del VSRRP (Lager *et al.*, 1999; Labarque *et al.*, 2003a).

Por último, las diferencias en el tropismo celular observada entre las distintas cepas vacunales estudiadas podría estar detrás de las diferencias encontradas en la transmisibilidad de cada una de ellas. De hecho, las diferencias en el número de centinelas infectados tras el contacto directo con los animales vacunados constituyen el resultado más llamativo de este estudio y el único parámetro en el que se han encontrado diferencias sustanciales entre las cuatro cepas estudiadas. Así, en el caso de las cepas Ingelvac® PRRS y Amervac® PRRS el contacto entre animales vacunados y animales susceptibles ha conducido a la infección del 100% de los animales centinelas en el primer caso y del 88,9% en el segundo, como ha quedado

demostrado por la determinación de viremia y, en muchos casos, la seroconversión de los mismos. Sin embargo, la proporción de centinelas infectados fue sustancialmente menor en las cepas que no se replican en MAPs. En el caso de los centinelas expuestos a animales vacunados con Porcilis® PRRS la infección se pudo demostrar en un 44,4%, lo que supone una situación más favorable que en los dos grupos anteriores. Sin embargo, el grupo en el que hubo una menor proporción de centinelas infectados fue el grupo expuesto a animales vacunados con la vacuna Pyrsvac-183® en el que sólo se pudo demostrar la transmisión al 22,2% de los centinelas. Las diferencias en el porcentaje de animales infectados en los distintos grupos fueron estadísticamente significativas cuando se compararon los resultados de los Grupos A y B con el C y también en la comparación entre el Grupo A y el D.

Estas diferencias en la tasa de transmisión de las distintas cepas vacunales contrastan claramente con la similitud encontrada en los patrones de eliminación de virus por las distintas rutas estudiadas (i.e. secreciones nasales, saliva y heces) en los animales vacunados con las distintas cepas vacunales y con la baja frecuencia de detección de virus en todos los grupos. Así, se observó que el patrón de eliminación de todos los virus vacunales por las distintas rutas fue parecido y similar al descrito para los aislados de campo, (Prieto *et al.*, 2004; Martínez-Lobo *et al.*, 2011a) siendo ligeramente superior en secreciones orales. Este hecho parece confirmar que el proceso de atenuación no cambia significativamente el tropismo tisular de los virus ni la distribución orgánica de los mismos. No obstante, nuestros datos no permiten identificar ninguna de las vías estudiadas como más importante que las demás para la transmisión debido a la baja frecuencia de aislamiento del virus obtenida para las distintas secreciones estudiadas. De forma genérica, se puede decir que el porcentaje de las muestras positivas osciló entre el 2,22% y el 7,78% dependiendo del tipo de muestra y el grupo considerado, sin que fuera posible detectar la existencia de diferencias estadísticamente significativas ni entre rutas ni entre grupos. Únicamente se puede destacar que la eliminación por todas las rutas estudiadas fue ligeramente más frecuente en los animales del Grupo A mientras que la menor frecuencia de eliminación, también por todas las rutas, se registró en el Grupo D. Diferencias en la frecuencia de eliminación podrían justificar diferencias en la tasa de transmisión. Así, en el caso de los aislados virulentos del VSRRP se ha comprobado que los aislados con mayor capacidad de transmisión se eliminan con mayor frecuencia, aunque no en mayor cantidad que los aislados que se transmiten con mayor dificultad (Choi *et al.*, 2007). Sin embargo, las diferencias en la frecuencia de eliminación entre grupos encontradas en nuestro estudio fueron poco llamativas y, aunque pueden haber contribuido, al menos en parte, a una mayor o menor difusión de las distintas cepas vacunales, no parecen suficientes, por sí solas, para justificar las diferencias tan claras encontradas en la tasa de transmisión entre los distintos grupos experimentales.

No obstante, hay que tener en cuenta que la frecuencia de eliminación del virus por distintas rutas podría estar subestimada. Esto se debe a las limitaciones de la técnica seleccionada para determinar la presencia de virus en las distintas secreciones, que no permitiría detectar cantidades muy bajas de virus por su relativamente baja sensibilidad. Como es esperable que la cantidad de virus eliminada por las distintas rutas sea escasa (Prieto *et al.*, 2004; Martínez-Lobo *et al.*, 2011a; Yoon *et al.*, 1993), es posible que alguna muestra que contuviera virus se haya considerado negativa. No obstante, la técnica de aislamiento vírico se seleccionó como

técnica de referencia para determinar la presencia de virus en las distintas secreciones porque para la transmisión únicamente es relevante el virus viable. La selección de técnicas de RT-PCR, incluso cuantitativas, que tienen una mayor sensibilidad presenta el grave inconveniente de que es imposible determinar si el ácido nucleico encontrado en la muestra se corresponde con virus infectivo o no. Por otro lado, hay que tener en cuenta que para que se produzca la transmisión es necesario alcanzar una dosis infectiva mínima y si bien ésta es muy baja por vía parenteral (Yoon *et al.*, 1999), parece que la infección por la vía oral o nasal, vía natural de entrada del virus y fuente más probable de infección para los centinelas en contacto directo con animales infectados, requiere de cantidades superiores de virus, cantidades que se podrían situar en torno a 10^4 DI₅₀CT para la vía nasal y en torno a $10^{5.3}$ DI₅₀CT para la vía oral (Hermann *et al.*, 2005). Si esto es realmente así, la presencia de cantidades muy bajas de virus en las distintas secreciones sólo supondría un riesgo real de transmisión en el caso de eliminación continuada y elevada supervivencia del virus fuera del hospedador.

Aunque con una técnica más sensible se podrían detectar diferencias más claras en la frecuencia de eliminación, hay que tener en cuenta que para que se produzca la transmisión es también necesario que el virus que se elimina sea infectivo y hay que recordar que, en este sentido, las cepas atenuadas pueden tener diferencias sustanciales con los aislados virulentos derivadas de los cambios producidos durante el proceso de atenuación. En concreto, las diferencias observadas en el tropismo celular de las distintas cepas vacunales podrían condicionar la infectividad del virus por distintas rutas. *A priori* cabría esperar que los virus que tengan un rango más amplio de tipos celulares a los que infectar serán más eficaces en la infección por distintas rutas que los que tengan un rango más limitado. Cuando la transmisión se produce por contacto directo, la ruta de entrada más probable del virus es la ruta oro-nasal pero la infección productiva por esta ruta requiere que el virus entre en contacto con células a las que pueda infectar y en las que pueda completar su ciclo de replicación. Se sabe que cuando los aislados de campo entran en el hospedador el virus se replica de forma casi inmediata en macrófagos (Rossow *et al.*, 1996) lo que da lugar al inicio de la infección. Sin embargo, en el caso de las cepas vacunales la vía habitual de entrada al organismo es la parenteral por lo que el curso de la infección es ligeramente diferente. Es más, los resultados de nuestro estudio indican que los virus que carecen de capacidad para replicarse en macrófagos, necesitan un periodo de tiempo más prolongado para ser capaces de establecer una viremia, incluso cuando son aplicados parenteralmente, lo que, de forma indirecta, indica que su capacidad de replicación es más limitada. Parece plausible pensar que esta capacidad más limitada de replicación podría dificultar o impedir el establecimiento de la infección cuando el virus entra en contacto con el cerdo de forma natural.

Esta mayor dificultad para establecer la infección en los animales susceptibles, junto con pequeñas diferencias en la frecuencia de eliminación del virus por distintas rutas, podría explicar las diferencias encontradas en la tasa de transmisión. Esta teoría estaría apoyada por el hecho de que la cepa que peor se replica *in vivo* (Pyrsvac-183®) es la que ha tenido una menor capacidad de transmisión y que la segunda cepa sin capacidad de replicación en los macrófagos alveolares (Porcilis® PRRS) ha presentado una tasa de transmisión superior a la primera, pero muy inferior a la observada en las cepas que sí se replican en macrófagos. Por otra parte, la existencia de diferencias en la capacidad de distintos virus atenuados para

infectar a lechones en crecimiento cuando son inoculadas por la vía intranasal ha sido demostrada previamente en nuestro grupo de investigación, en un trabajo en el que se expusieron 15 lechones de cuatro semanas de vida a las cepas vacunales de Ingelvac® PRRS, Prime Pac®, Amervac® PRRS y Porcilis® PRRS por la vía intranasal para actuar como controles en un estudio cuyo objetivo fundamental era comparar la virulencia de distintos aislados de campo. Los resultados de aquel estudio demuestran que la aplicación intranasal de cepas atenuadas del VSRRP es, en general, menos eficiente en el establecimiento de la infección que la ruta intramuscular. Así, tras la exposición de los animales a 10^5 DI₅₀CT sólo se consiguió la infección del 100% de los animales en el grupo expuesto a la cepa vacunal Ingelvac® PRRS. Por el contrario en el grupo expuesto a la cepa vacunal Amervac® PRRS solo se infectaron ocho de los quince animales y en el expuesto a la cepa vacunal Porcilis® PRRS siete de los quince. Estos resultados indican que la cepa Ingelvac® PRRS es más eficiente en la infección intranasal que las demás cepas vacunales, siendo estos resultados completamente coherentes con los obtenidos en el presente estudio. Sin embargo, en el caso de la cepa Amervac® PRRS la capacidad de infección intranasal observada en el estudio anteriormente mencionado fue inferior a la capacidad de transmisión encontrada en el presente estudio. Aunque desconocemos las razones que pueden explicar estas diferencias es posible que, durante la replicación en el hospedador, se hayan seleccionado poblaciones de virus mejor adaptadas a la replicación en distintos tipos celulares y haya ganado capacidad infectiva por la ruta oro-nasal. Esta teoría estaría apoyada por la aparición, al menos a partir del día 12 p.v. de muestras biológicas que contienen una cantidad de virus capaz de replicarse en cultivos primarios de MAPs suficiente para que se puedan detectar fácilmente *in vitro* por la aparición de efecto citopático. Es verosímil que esta población de virus con mayor capacidad de replicación en MAPs sea más eficaz en el establecimiento de la infección tras el contacto oro-nasal.

Es más, la determinación de la eliminación de virus vacunales por parte de los centinelas infectados parece indicar que en el caso de las cepas vacunales que no se replican en MAPs la eliminación tras la infección es muy baja, mientras que en el caso de la cepa Ingelvac® PRRS, que tuvo una frecuencia algo mayor de eliminación en los lechones vacunados y se transmitió a todos los centinelas, los animales centinelas eliminaron el virus con una frecuencia media comparable a la de los animales vacunados, aunque con un patrón de eliminación diferente ya que, en este caso, la mayor frecuencia de eliminación se encontró en las secreciones nasales y la menor en las heces. Finalmente, en el caso de la cepa Amervac® PRRS, que se había transmitido de forma bastante eficiente a los animales centinelas, la frecuencia media de eliminación por parte de los centinelas fue inferior a la registrada en los lechones vacunados. Estos resultados parecen indicar que la cepa que se eliminó en mayor proporción tras la vacunación de lechones mantiene una capacidad de eliminación relativamente alta en los animales infectados de forma secundaria lo que, unido a una tasa de transmisión del 100%, podría dar lugar al mantenimiento de la circulación del virus vacunal en animales no vacunados. Por el contrario, al menos en el caso de las cepas que se transmiten a una proporción limitada de animales, parece poco probable que la circulación del virus vacunal se pueda mantener en una población no vacunada debido a la combinación de una baja eficiencia de transmisión y una pobre eliminación de virus por parte de los animales que se infectan de forma secundaria. Este hallazgo es muy relevante en relación con la seguridad de las cepas vacunales ya que una vacuna que tenga una tasa de reproducción menor de uno no se

mantendrá circulando en la población y será mucho más segura que una cepa que tenga una tasa de reproducción superior a 1 ya que en este caso la cepa vacunal circulará de forma incontrolada en poblaciones susceptibles. El mantenimiento de la circulación de virus vacunales aumenta considerablemente el riesgo de reversión a virulencia, sobre todo en virus con una alta tasa de mutaciones como es el caso del VSRRP ya que en cada ciclo de replicación se producen cambios aleatorios en el genoma del virus que, si no son letales para el virus, se podrían mantener en el tiempo. Es más, aquellos cambios que faciliten la replicación del virus *in vivo* se mantendrán por un proceso de ventaja competitiva con poblaciones que se repliquen menos eficientemente y los cambios que conducen a una replicación más eficiente podrían conducir a un aumento en la virulencia, sobre todo si tenemos en cuenta que se ha relacionado una mayor capacidad de replicación con una mayor virulencia (Johnson *et al.*, 2004; Karniychuk *et al.*, 2009). De hecho, la aplicación sistemática, aunque con un uso fuera de etiqueta, de la vacuna Ingelvac® PRRS en Dinamarca, en el marco de un programa de control de la enfermedad, condujo a la aparición de virus, aparentemente derivados de la cepa vacunal, que producían la sintomatología típica de la enfermedad (Bøtner *et al.*, 1997; Kranker *et al.*, 1998). Estos fenómenos de reversión a la virulencia de la cepa vacunal Ingelvac® PRRS se ha descrito también en EE.UU. (Mengeling *et al.*, 1999b; Opriessnig *et al.*, 2002), mientras que para otras cepas vacunales no han podido ser confirmadas en ningún estudio, aunque hay sospechas de que pueden haber ocurrido.

A pesar de lo anteriormente mencionado, hay que destacar que nuestro estudio no estaba diseñado para determinar la tasa de reproducción por lo que no nos ha sido posible establecer cuántos animales susceptibles es capaz de infectar un animal infectado, dato clave para poder determinar si la infección muere por sí sola o si, por el contrario, el virus vacunal se mantiene en la población. Sin embargo, y debido a que la única diferencia sustancial hallada en nuestro estudio entre las distintas cepas vacunales estudiadas reside en la tasa de transmisión, sería aconsejable realizar un estudio encaminado específicamente a conocer la tasa de reproducción en cada caso para poder determinar el riesgo real de transmisión y de reversión a virulencia por pases seriados en su hospedador natural.

Por tanto, y como conclusión, se puede decir que las cepas atenuadas del VSRRP que se incorporan en las vacunas vivas atenuadas disponibles comercialmente en nuestro país son seguras en términos clínicos ya que ninguna de ellas es capaz de producir enfermedad detectable en los animales vacunados y que las lesiones pulmonares a las que dan lugar son muy leves. Sin embargo, y a pesar de ser apatógenas para los lechones, se replican extensamente en los mismos, dando lugar a viremias prolongadas en los animales vacunados y presentando una amplia distribución orgánica. La única diferencia significativa encontrada entre las distintas cepas vacunales estudiadas hace referencia a su capacidad de replicación en cultivos primarios de MAPs, que ha sido demostrada en las cepas vacunales Ingelvac® PRRS y Amervac® PRRS mientras que no ha sido posible encontrar ninguna muestra positiva en el caso de las vacunas Porcilis® PRRS y Pysrvac-183®. Esta incapacidad para replicarse en MAPs podría explicar su menor presencia en el pulmón de los animales vacunados, comparativamente con las otras dos cepas vacunales y su menor capacidad de transmisión a animales centinelas, posiblemente relacionado con una menor capacidad de eliminación y con una menor infectividad por la vía oro-nasal de la población de virus eliminada.

6. CONCLUSIONES

Dado que para la consecución del objetivo general de esta tesis doctoral se han diseñado tres objetivos específicos, las conclusiones derivadas de los estudios realizados se han separado en tres apartados con el fin de esclarecer la comprensión de las mismas.

A. Conclusiones que se derivan de la determinación de la inocuidad del producto vacunal a la dosis recomendada por el fabricante y sobre la especie animal para la que va destinada.

1. Las cepas atenuadas del VSRRP que se incorporan en las vacunas vivas atenuadas disponibles comercialmente en nuestro país son seguras en términos clínicos ya que ninguna de ellas es capaz de producir reacciones adversas tras la inoculación ni signos clínicos atribuibles a la enfermedad en los animales vacunados.
2. Las lesiones pulmonares, tanto macroscópicas como microscópicas, a las que dan lugar son muy leves afectando a una proporción muy pequeña de la superficie pulmonar y sin llegar a producir ningún tipo de alteración en la capacidad respiratoria de los animales, aunque siendo más frecuentes y graves en las fases tardías tras la vacunación con las cepas Ingelvac® PRRS MLV y Amervac® PRRS.

B. Conclusiones que se derivan de la determinación de la capacidad de replicación in vivo de cada uno de los virus atenuados que componen las distintas vacunas.

1. Las cuatro cepas vacunales se replican extensamente dando lugar a viremias prolongadas en los animales vacunados y presentando una amplia distribución orgánica.
2. La única diferencia significativa encontrada entre las distintas cepas vacunales estudiadas hace referencia a su capacidad de replicación en cultivos primarios de MAPs, que ha sido demostrada en las cepas vacunales Ingelvac® PRRS MLV y Amervac® PRRS. En el caso de las vacunas Porcilis® PRRS y Pyrsvac-183®, a pesar de demostrar la existencia del virus mediante el aislamiento en la línea celular MARC-145, no fue posible encontrar ninguna muestra positiva cuando se usaron cultivos de MAPs.

C. Conclusiones que se derivan de la determinación de la capacidad de transmisión de los distintos virus atenuados a animales centinelas que han sido puestos en contacto con los animales vacunados.

1. Las diferencias en el número de centinelas infectados tras el contacto directo con los animales vacunados fueron sustancialmente llamativas entre las cuatro cepas

vacunales estudiadas, siendo la proporción de centinelas infectados mayor en el caso de las cepas vacunales Ingelvac® PRRS MLV y Amervac® PRRS en comparación con lo observado en los animales susceptibles que estuvieron en contactos con los animales vacunados con las otras dos cepas vacunales, Porcilis® PRRS y Pyrsvac-183®.

A partir de todas estas conclusiones podemos decir que en conjunto los resultados indican que todas las vacunas pueden considerarse clínicamente seguras. Sin embargo, se ha observado que ni la vacuna Porcilis® PRRS ni Pyrsvac-183® pudieron detectarse en cultivos de MAPs o en los cortes de pulmón utilizados para determinar el VSRRP mediante inmunohistoquímica, indicando todo esto que estos virus podrían haber perdido su capacidad de replicación en MAPs, pudiendo relacionarse esta incapacidad con la baja tasa de transmisión y el retraso en el comienzo de la viremia observada en estos grupos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aasted, B., Bach, P., Nielsen, J., Lind, P.** (2002). Cytokine profiles in peripheral blood mononuclear cells and lymph node cells from piglets infected in utero with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 1229-1234.
- Ait-Ali, T., Wilson, AD., Westcott, DG., Clapperton, M., Waterfall, M., Mellencamp, MA., Drew, TW., Bishop, SC., Archibald, AL.** (2007). Innate immune responses to replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in isolated Swine alveolar macrophages. *Viral Immunol.* 20, 105-118.
- Akira, S., Takeda, K.** (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499-511.
- Albina, E., Madec, F., Cariolet, R., Torrison, J.** (1994). Immune response and persistence of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected pigs and farm units. *Vet. Rec.* 134, 567-573.
- Albina, E., Carrat, C., Charley, B.** (1998a). Interferon- α response to swine arterivirus (PoAV), the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Interferon Cytokine Res.* 18, 485-490.
- Albina, E., Piriou, L., Hutet, E., Cariolet, R., L'Hospitalier, R.** (1998b). Immune responses in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 61, 49-66.
- Albina, E., Mesplède, A., Chenut, G., Le Potier, MF., Bourbao, G., Le Gal, S., Leforban, Y.** (2000). A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boars from 1991 to 1998. *Veterinary Microbiology*, 77, 43-57.
- Allende, R., Lewis, TL., Lu, Z., Rock, DL., Kutish, GF., Ali, A., Doster, AR., Osorio, FA.** (1999). North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. *J. Gen. Virol.* 80, 307-15.
- Allende, R., Kutish, GF., Laegreid, W., Lu, Z., Lewis, TL., Rock, DL., Friesen, J., Galeota, JA., Doster, AR., Osorio, FA.** (2000). Mutations in the genome of porcine reproductive and respiratory syndrome virus responsible for the attenuation phenotype. *Arch. Virol.* 145, 1149-1161.
- Alno, JP., Dethinne, M., Guillaume, JM., Hamon, P., Laval, A., Long, T., Renoult, C., Roche, R.** (2000). Field efficacy of a new killed vaccine against PRRS for breeder pigs. In: *Proceedings: The 16th International Pig Veterinary Society Congress, Melbourne, Australia.*
- Andreyev, VG., Wesley, RD., Mengeling, WL., Vorwald, AC., Lager, LM.** (1997). Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5. *Arch. Virol.* 142, 993-1001.

- Ansari, IH., Kwon, B., Osorio, FA., Pattnaik, AK.** (2006). Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *J. Virol.* 80, 3994-4004.
- Barfoed, AM., Blixenkrone-Møller, M., Jensen, MH., Bøtner, A., Kamstrup, S.** (2004). DNA vaccination of pigs with open reading frame 1-7 of PRRS virus. *Vaccine* 22, 3628-41.
- Baroch, JA., Gagnon, CA., Lacouture, S., G M.** (2015). Exposure of feral swine (*Sus scrofa*) in the United States to selected pathogens. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 79, 74-78.
- Bastos, RG., Dellagostin, OA., Barletta, RG., Doster, AR., Nelson, E., Zuckermann, F., Osorio, FA.** (2004). Immune response of pigs inoculated with *Mycobacterium bovis* BCG expressing a truncated form of GP5 and M protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 22, 467-474.
- Batista, L., Pijoan, C., Lwamba, H., Johnson, CR., Murtaugh, MP.** (2004). Genetic diversity and possible avenues of dissemination of PRRSV in two geographic regions of Mexico. *J. Swine Health Prod.* 12, 170-175.
- Bautista, EM., Goyal, SM., Collins, JE.** (1993b). Serologic survey for Lelystad and VR-2332 strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in US swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 612-614.
- Bautista, EM., Molitor, TW.** (1997). Cell-mediated immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine. *Viral Immunol.* 10, 83-94.
- Bautista, EM., Molitor, TW.** (1999). IFN gamma inhibits porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication in macrophages. *Arch. Virol.* 144, 1191-1200.
- Bautista, EM., Suárez, P., Molitor, TW.** (1999). T cell responses to the structural polypeptides of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch. Virol.* 144, 117-34.
- Beilage, EG., Beilage, TG.** (2003). Performance after herd vaccination with Porcilis®-PRRS in persistently infected farrow-to-finish herds. En: *4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases*, Roma, Italia, pp. 109-110.
- Benfield, DA., Nelson, E., Collins, JE., Harris, L., Goyal, SM., Robinson, D., Christianson, WT., Morrison, RB., Gorcyca, D., Chladek, D.** (1992a). Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 127-133.
- Benfield, DA., Nelson, E., Christopher-Hennings, J., Collins, J., Chladek, D., Christianson, W., Morrison, R., Gorcyca, D.** (1992b). Properties of SIRS isolate ATCC VR-2332 in United States and preliminary characterization of a monoclonal antibody to this virus. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.* 4, 19-21.
- Benfield, DA., Christopher-Hennings, J., Nelson, EA., Rowland, RRR., Nelson, JK., Chase, CCL., Rossow, KD.** (1997). Persistent fetal infection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. En: *Proc. 28th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, Québec, Canadá. pp. 455-458.

- Benson, JE., Yaeger, MJ., Christopher-Hennings, J., Lager, K., Yoon, KJ.** (2002). A comparison of virus isolation, immunohistochemistry, fetal serology, and reverse-transcription polymerase chain reaction assay for the identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus transplacental infection in the fetus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14, 8-14.
- Beura, LK., Sarkar, SN., Kwon, B., Subramaniam, S., Jones, C., Pattnaik, AK., Osorio, FA.** (2010). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1beta modulates host innate immune response by antagonizing IRF3 activation. *J. Virol.* 84, 1574-1584.
- Bierk, MD., Dee, SA., Rossow, KD., Otake, S., Collins, JE., Molitor, TW.** (2001a). Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from persistently infected sows to contact controls. *Can. J. Vet. Res.* 65, 261-266.
- Bierk, MD., Dee, SA., Rossow, KD., Collins, JE., Guedes, MI., Pijoan, C., Molitor, TW.** (2001b). Diagnostic investigation of chronic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a breeding herd of pigs. *Vet. Rec.* 148, 687-690.
- Blackburn, PW.** (1991). PRRS – The impact of the disease on the pig industry – the experience of veterinary practice in the UK. En: *Eur. Comm. Seminar on PRRS*. Bruselas, Bélgica. Cap. 15.
- Bonilauri, P., Merialdi, G., Dottori, M., Barbieri, I.** (2006). Presence of PRRSV in wild boar in Italy. *The Veterinary Record*, 158, 107-108.
- Bøtner, A., Strandbygaard, B., Sorensen, K., Have, P., Madsen, KG., Madsen, E., Alexandersen, S.** (1997). Appearance of acute PRRS-like symptoms in sow herds after vaccination with a modified live PRRS vaccine. *Vet. Rec.* 141, 497-499.
- Bouwkamp, FT., Geudeke, MJ.** (1999). Some experiences of PRRS vaccination in sows. En: *3rd International Symposium on PRRS and Aujeszky's Disease*, Ploufragan, France, p.p. 225-226.
- Buddaert, W., Van Reeth, K., Pensaert, M.** (1998). In vivo and in vitro interferon studies with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Adv. Exp. Med. Biol.* 440, 461-467.
- Calzada-Nova, G., Schnitzlein, W., Husmann, R., Zuckermann, FA.** (2010). Characterization of the cytokine and maturation responses of pure populations of porcine plasmacytoid dendritic cells to porcine viruses and toll-like receptor agonists. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 135, 20-33.
- Canals, A., Sánchez, C., Kovács, F., Salleras, JM., Arias, M., Agüero, M., Fernández, J., Romero, L., Sánchez-Vizcaíno, JM.** (2000). Effect of vaccination of pregnant gilts with one dose of Ingelvac®PRRS MLV on the reproductive failure after challenge with PRRS European isolate at day 90 of gestation. En: *16th International Pig Veterinary Society Congress*, Melbourne, Australia, p. 599.
- Cancel-Tirado, SM., Evans, RB., Yoon, K.** (2004). Monoclonal antibody analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus epitopes associated with antibody-dependent enhancement and neutralization of virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 249-262.

- Carlsson, U., Wallgren, P., Renström, LHM., Lindberg, A., Eriksson, H., Thorén, P., Eliasson-Selling, L., Lundeheim, N., Nörregård, E., Thörn, C., Elvander, M.** (2009). Emergence of porcine reproductive and respiratory syndrome in Sweden: Detection, response and eradication. *Transboundary and Emerging Diseases*, 56, 121-131.
- Cavanagh, D.** (1997). Nidovirales: a new order comprising Coronaviridae and Arteriviridae. *Arch. Virol.* 142, 629-633.
- Chang, CC., Yoon, KY., Zimmerman, JJ., Harmon, KM., Dixon, PM., Dvorak, CMT., Murtaugh, MP.** (2002). Evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during sequential passages in pigs. *J. Virol.* 76, 4750-4763.
- Chang, HC., Peng, YT., Chang, HL., Chaung, HC., Chung, WB.** (2008). Phenotypic and functional modulation of bone marrow-derived dendritic cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 129, 281-293.
- Charerntantanakul, W., Platt, R., Roth, JA.** (2006). Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected antigen-presenting cells on T cell activation and antiviral cytokine production. *Viral Immunol.* 19, 646-661.
- Chaung, HC., Chen, CW., Hsieh, BL., Chung, WB.** (2010). Toll-like receptor expressions in porcine alveolar macrophages and dendritic cells in responding to poly IC stimulation and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 33, 197-213.
- Chen, Z., Lawson, S., Sun, Z., Zhou, X., Guan, X., Christopher-Hennings, J., Nelson, EA., Fang, Y.** (2010). Identification of two auto-cleavage products of nonstructural protein 1 (nsp1) in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infected cells: nsp1 function as interferon antagonist. *Virology* 398, 87-97.
- Chen, N., Cao, Z., Yu, X., Deng, X., Zhao, T., Wang, L., Liu, Q., Li, X., Tian, K.** (2011). Emergence of novel European genotype porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mainland China. *J. Gen. Virol.* 92, 880-892.
- Cheon, DS., Chae, C.** (2000). Antigenic variation and genotype of isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Korea. *Vet. Rec.* 147, 215-218.
- Chiou, MT., Jeng, CR., Chueh, LL., Cheng, CH., Pang, VF.** (2009). Effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (isolate tw91) on porcine alveolar macrophages in vitro. *Vet. Microbiol.* 71, 9-25.
- Choi, C., Cho, WS., Kim, B., Chae, C.** (2002). Expression of Interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in pigs experimentally infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV). *J. Comp. Pathol.* 127, 106-113.
- Christianson, WT., Collins, JE., Benfield, DA., Harris, L., Gorcyca, DE., Chladek, DW., Morrison, RB., Joo, HS.** (1992). Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. *Am. J. Vet. Res.* 53, 485-488.

Christianson, WT., Choi, CS., Collins, JE., Molitor, TW., Morrison, RB., Joo, HS. (1993). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Can. J. Vet. Res.* 57, 262-268.

Christopher-Hennings, J., Nelson, EA., Hines, RJ., Nelson, JK., Swenson, SL., Zimmerman, JJ., Chase, CL., Yaeger, MJ., Benfield, DA. (1995a). Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 456-464.

Christopher-Hennings, J., Nelson, EA., Nelson, JK., Hines, RJ., Swenson, SL., Hill, HT., Zimmerman, JJ., Katz, JB., Yaeger, MJ., Chase, CCL., Benfield, DA. (1995b). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1730-1734.

Christopher-Hennings, J., Nelson, EA., Hines, RJ., Nelson, JK., Benfield, DA. (1997). Effects of a modified-live virus vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome in boars. *Am. J. Vet. Res.* 58, 40-45.

Christopher-Hennings, J., Nelson, EA., Nelson, JK., Rossow, KD., Shivers, JL., Yaeger, MJ., Chase, CC., Garduno, RA., Collins, JE., Benfield, DA. (1998). Identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen and tissues from vasectomized and nonvasectomized boars. *Vet. Pathol.* 35, 260-267.

Christopher-Hennings, J., Holler, LD., Benfield, DA., Nelson, EA. (2001). Detection and duration of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen, serum, peripheral blood mononuclear cells, and tissues from Yorkshire, Hampshire, and Landrace boars. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13, 133-142.

Chueh, LL., Lee, KH., Wang, Fl., Pang, VF., Weng, CN. (1998). Sequence analysis of the nucleocapsid protein gene of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus Taiwan MD-001 strain. *Adv. Exp. Med. Biol.* 440, 795-799.

Collins, JEB., Christianson, WT., Harris, L., Christopher-Hennings, J., Shaw, DP., Goyal, SM., McCullough, S., Morrison, RB., Joo, HS., Gorcycya, D., Chladek, D. (1992). Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 117-126.

Corzo, CA., Mondaca, E., Wayne, S., Torremorell, M., Dee, S., Davies, P., Morrison, RB. (2010). Control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res.* 154, 185-192.

Costers, S., Lefebvre, DJ., Delputte, PL., Nauwynck, HJ. (2008). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates apoptosis during replication in alveolar macrophages. *Arch. Virol.* 153, 1453-1465.

Costers, S., Lefebvre, DJ., Goddeeris, B., Delputte, PL., Nauwynck, HJ. (2009). Functional impairment of PRRSV-specific peripheral CD3+CD8 high cells. *Vet. Res.* 40, 46.

- Costers, S., Lefebvre, DJ., Van Doorselaere, J., Vanhee, M., Delputte, PL., Nauwynck, HJ.** (2010). GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus contains a neutralizing epitope that is susceptible to immunoselection *in vitro*. *Arch. Virol.* 155, 371-378.
- Darwich, L., Díaz, I., Mateu, E.** (2010). Certainties, doubts and hypotheses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunobiology. *Virus Res.* 154, 123-132.
- De Abin, MF., Spronk, G., Wagner, M., Fitzsimmons, M., Abrahante, JE., Murtaugh, MP.** (2009). Comparative infection efficiency of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus field isolates on MA104 cells and porcine alveolar macrophages. *Can. J. Vet. Res.* 73, 200-204.
- De Baere, MI., Van Gorp, H., Delputte, PL., Nauwynck, HJ.** (2012). Interaction of the European genotype porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) with sialoadhesin (CD169/Siglec-1) inhibits alveolar macrophage phagocytosis. *Vet. Res.* 43, 47.
- De Jong, MF., Cromwijk, W., van't Veld, P.** (1991). The new pig disease: epidemiology and production losses in the Netherlands. En: *Eur. Comm. Seminar on PRRS*. Bruselas, Bélgica. Cap. 4.
- De Lima, M., Pattnaik, AK., Flores, EF., Osorio, FA.** (2006). Serologic marker candidates identified among B-cell linear epitopes of Nsp2 and structural proteins of a North American strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 353, 410-421.
- De Villiers, PJ., Steele, AD., Hiemstra, LA., Rappaport, R., Dunning, AJ., Gruber, WC., Forrest, BD.** (2009). Efficacy and safety of a live attenuated influenza vaccine in adults 60 years of age and older. *Vaccine* 28, 228-234.
- Dea, S., Gagnon, H., Mardassi, H., Pirzadeh, B., Rogan, D.** (2000). Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory síndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch. Virol.* 145, 659-688.
- Dee, SA., Joo, JS.** (1994). Recurrent reproductive failure associated with porcine reproductive and respiratory syndrome in a swine herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2005, 1017-1018.
- Dee, S., Joo, HS., Pijoan, C.** (1995). Controlling the spread of PRRS virus in the breeding herd through management of the gilt pool. *J. Swine Health Prod.* 3, 64-69.
- Dee, SA.** (1996). The porcine respiratory disease complex: are subpopulations important? *Swine Health and Production* 4, 147-149.
- Dee, SA., Joo, HS., Polson, DD.** (1996a). Improved performance of a large pig complex after sequential nursery depopulation. *Vet. Rec.* 138, 31-34.
- Dee, SA., Molitor, TW.** (1998). Elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using a test and removal process. *Vet. Rec.* 143, 474-476.
- Dee, SA., Torremorell, M., Rossow, K., Mahlum, C., Otake, S., Faaberg, K.** (2001). Identification of genetically diverse sequences (ORF 5) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a swine herd. *Can. J. Vet. Res.* 65, 254-260.

- Dee, S., Deen, J., Rossow, K., Wiese, C., Otake, S., Eliason, R., Joo, HS., Pijoan, C.** (2002). Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus throughout a coordinated sequence of events during warm weather. *Can. J. Vet. Res.* 66, 232-239.
- Dee, S., Deen, J., Rossow, K., Wiese, C., Otake, S., Joo, HS., Pijoan, C.** (2003). Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus throughout a coordinated sequence of events during cold weather. *Can. J. Vet. Res.* 67, 12-19.
- Dee, SA., Otake, S., Deen, J.** (2010). Use of a production region model to assess the efficacy of various air filtration systems for preventing airborne transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*: Results from a 2-year study. *Virus Research*, 154, 177-184.
- Delputte, PL., Vanderheijden, N., Nauwynck, HJ, Pensaert, MB.** (2002). Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages. *J. Virol.* 76, 4312-4320.
- Delputte, PL., Nauwynck, HJ.** (2004a). Porcine arterivirus infection of alveolar macrophages is mediated by sialic acid on the virus. *J. Virol.* 78, 8094-8101.
- Delputte, PL., Meerts, P., Costers, S., Nauwynck, HJ.** (2004b). Effect of virus-specific antibodies on attachment, internalization and infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in primary macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 179-188.
- Delputte, PL., Costers, S., Nauwynck, HJ.** (2005). Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization: distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin. *J. Gen. Virol.* 86, 1441-1445.
- Delputte, PL., Nauwynck, HJ.** (2006). Porcine arterivirus entry in macrophages: heparan sulfate-mediated attachment, sialoadhesin-mediated internalization, and a cell-specific factor mediating virus disassembly and genome release. *Adv. Exp. Med. Biol.* 581, 247-252.
- Den Boon, JA., Faaberg, KS., Meulenberg, JJ., Wassenaar, AL., Plagemann, PG., Gorbalenya, AE., Snijder, EJ.** (1995). Processing and evolution of the N-terminal region of the arterivirus replicase ORF1a protein: identification of two papainlike cysteine proteases. *J. Virol.* 69, 4500.
- Desrosiers, R.** (2000). Vaccination of piglets to prevent PRRS nursery problems: results obtained on a 1200 sow farm. En: *16th International Pig Veterinary Society Congress*, Melbourne, Australia, 649.
- Dewey, CE., Wilson, S., Buck, P., Leyenaar, JK.** (1999). The reproductive performance of sows after PRRS vaccination depends on stage of gestation. *Prev. Vet. Med.* 40, 233-241.
- Dial, GD., Hull, RD., Olson, CL., Hill, HT., Erickson, GA.** (1990). Mystery swine disease: implications and needs of the North American swine industry. En: *MSD Comm. Meet.* Denver, USA. pp. 3-6.

- Díaz, I., Darwich, L., Pappaterra, G., Pujols, J., Mateu, E.** (2005). Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 86, 1943-1951.
- Díaz, I., Darwich, L., Pappaterra, G., Pujols, J., Mateu, E.** (2006) Different European-type vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome virus have different immunological properties and confer different protection to pigs. *Virology* 351, 249-259.
- Díaz, I., Pujols, J., Ganges, L., Gimeno, M., Darwich, L., Domingo, M., Mateu, E.** (2009). In silico prediction and ex vivo evaluation of potential T-cell epitopes in glycoproteins 4 and 5 and nucleocapsid protein of genotype-I (European) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 27, 5603-5611.
- Díaz, I., Venteo, Á., Rebollo, B., Martín-Valls, GE., Simon-Grifé, M., Sanz, A., Mateu, E.** (2012). Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 24, 344-348.
- Done, SH., Paton, DJ., Brown, I., Cooley, W.** (1992). Pathology of porcine reproductive and respiratory syndrome in the UK. En: *Proc. 12th IPVS Congress*. La Haya, Holanda. p. 111.
- Done, SH., Paton, DJ.** (1995). Porcine reproductive and respiratory syndrome: clinical disease, pathology and immunosuppression. *Vet. Rec.* 136, 32-35.
- Drew, TW., Meulenbergh, JJ., Sands, JJ., Paton, DJ.** (1995). Production, characterization and reactivity of monoclonal antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 76, 1361-1369.
- Drew, TW., Lowings, JP., Yapp, F.** (1997). Variation in open reading frames 3, 4 and 7 among porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the U.K. *Vet. Microbiol.* 55, 209-221.
- Drolet, R., Larochelle, R., Morin, M., Delisle, B., Magar, R.** (2003). Detection rates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2 and swine influenza virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia. En: *Proc. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases*, Roma, Italia, p.p. 91-92.
- Duan, X., Nauwynck, HJ., Pensaert, MB.** (1997). Virus quantification and identification of cellular targets in the lungs and lymphoid tissues of pigs at different time intervals after inoculation with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Microbiol.* 56, 9-19.
- Egbering, O.** (2002). Field study on the PRRSV whole herd vaccination in Germany. En: *17th Congress of the International Pig Veterinary Society*, Ames, Iowa, EE.UU., p. 288.
- Eger, S.** (2000). Blitz-vaccination with a modified live vaccine to control PRRSV induced reproductive disorders in sows-a case study from Germany. En: *16th International Pig Veterinary Society Congress*, Melbourne, Australia, p. 644.

Evans, CM., Medley, GF., Creasey, SJ., Green, LE. (2010). A stochastic mathematical model of the within-herd transmission dynamics of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): Fade-out and persistence. *Preventive Veterinary Medicine*, 93, 248-257

Fang, Y., Schneider, P., Zhang, WP., Faaberg, KS., Nelson, EA., Rowland, RR. (2007). Diversity and evolution of a newly emerged North American Type 1 porcine arterivirus: analysis of isolates collected between 1999 and 2004. *Arch. Virol.* 152, 1009-1017.

Feitsma, H., Grooten, HJ., V Schie, FW., Colenbrander, B. (1992). The effect of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) on sperm production. En: *Proc 12th Internl Congress An Reprod.* La Haya, Holanda. pp. 1710-1712.

Fernández, A., Prieto, C., Vázquez, A., Álvarez, E., Ávila, A., Salgado, MD., Castro, JM. (2003). Porcine reproductive and respiratory síndrome virus (PRRSV) envelope GP5 protein fails to Project pigs against PRRSV. En: *4th International Symposium on Emerging and Re-Emerging Pig Diseases*, Roma, Italia, pp. 79-80.

Flores-Mendoza, L., Silva-Campa, E., Reséndiz, M., Osorio, FA., Hernández, J. (2008). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infects mature porcine dendritic cells and up-regulates interleukin-10 production. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 720-725.

Forrest, BD., Steele, AD., Hiemstra, L., Rappaport, R., Ambrose, CS., Gruber, WC. (2011). A prospective, randomized, open-label trial comparing the safety and efficacy of trivalent live attenuated and inactivated influenza vaccines in adults 60 years of age and older. *Vaccine* 29, 3633-3639.

Forsberg, R., Storgaard, T., Nielsen, HS., Oleksiewicz, MB., Cordioli, P., Sala, G., Hein, J., Bøtner, A. (2002). The genetic diversity of european type PRRSV is similar to that of the north american type but is geographically skewed within Europe. *Virology* 299, 38-47.

Frey, M., Eernisse, K., Landgraf, J., Pearson, J., Chladek, D. (1992). Diagnostic testing for SIRS virus at the National Veterinary Services Laboratories (NVSL). *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.* 4, 31.

Gagnon, CA., Lachapelle, G., Langelier, Y., Massie, B., Dea, S. (2003). Adenoviral-expressed GP5 of porcine respiratory and reproductive syndrome virus differs in its cellular maturation from the authentic viral protein but maintains known biological functions. *Arch. Virol.* 148, 951-972.

Gao, ZQ., Guo, X., Yang, HC. (2004). Genomic characterization of two Chinese isolates of porcine respiratory and reproductive syndrome virus. *Arch. Virol.* 149, 1341-1351.

Gass-Cofre, A., Beilage, E., Schreiber, A., Noé, T. (2004). The safety and efficacy of a simultaneous PRRS (Progressis®) and PPV/Erysipelas (Parvoruvac®) vaccination in endemically PRRSV infected breeding herds. In: *Proc. of the 18th International Pig Veterinary Society Congress*, Hamburg, Germany, p. 120.

Genini, S., Delputte, PL., Malinverni, R., Cecere, M., Stella, A., Nauwynck, HJ., Giuffra, E. (2008). Genome-wide transcriptional response of primary alveolar macrophages following

infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 89, 2550-2564.

Goldberg, TL., Weigel, RM., Hahn, EC., Scherba, G. (2000a). Associations between genetics, farm characteristics and clinical disease in field outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Prev. Vet. Med.* 43, 293-302.

Gonin, P., Mardassi, H., Gagnon, CA., Massie, B., Dea, S. (1998). A nonstructural and antigenic glycoprotein is encoded by ORF3 of the IAF-Klop strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch. Virol.* 143, 1927-1940.

Gonin, P., Pirzadeh, B., Gagnon, CA., Dea, S. (1999). Seroneutralization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus correlates with antibody response to the GP5 major envelope glycoprotein. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 20-26.

Gorcycya, D., Spronk, G., Morrison, R., Polson, D. (1995). Field evaluation of a new MLV PRRS virus vaccine: applications for PRRS prevention and control in swine herds. *Am. Assoc. Swine Pract.*, 401-411.

Gorcycya, D., Schlesinger, KJ., Geeding, PW., Chladek, DW., Short, JA. (1996b). Protection against the reproductive disease caused by porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by vaccinating with a modified live virus PRRS vaccine prior to breeding. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bologna, Italia, p.66.

Gorcycya, D., Schlesinger, K., Chladek, D. (1997a). A summary of experimental and field studies evaluating the safety and efficacy of RespPRRS/ReproTM for the control of PRRS-induced reproductive disease. *Am. Assoc. Swine Pract.*, 203-214

Gorcycya, D., Schlesinger, BS., Chladek, DC., Roof, MB., Polson, DD., Daniel, M., Primo, R. (1997b). Efficacy study of PRRS modified live virus (MLV) vaccine when administered to pregnant sows or gilts in the second trimester of gestation and experimentally challenged in the third trimester. *Am.Assoc.Swine Pract.*, p.p. 175-176.

Gradil, C., Dubuc, C., Eaglesome, MD. (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: seminal transmission. *Vet. Rec.* 138, 521-522.

Halbur, PG., Andrews, JJ., Huffman, EL., Paul, PS., Meng, XJ., Niyo, Y. (1994). Development of a streptavidin-biotin immunoperoxidase procedure for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in porcine lung. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 254-257.

Halbur, PG., Miller, LD., Paul, PS., Meng, XJ., Huffman, EL., Andrews, JJ. (1995a). Immunohistochemical identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen in the heart and lymphoid system of three-week-old colostrum-deprived pigs. *Vet. Pathol.* 32, 200-204.

Halbur, PG., Paul, PS., Frey, ML., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, XJ., Lum, MA., Andrews, JJ., Rathje, JA. (1995b). Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet. Pathol.* 32, 648-660.

Halbur, PG., Paul, PS., Frey, ML., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, XJ., Andrews, JJ., Lum, MA., Tathje, JA. (1996a). Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet. Pathol.* 33, 159-170.

Halbur, PG., Paul, PS., Meng, XJ., Lum, MA., Andrews, JJ. Rathje, JA. (1996b). Comparative pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in a five-week-old, cesarean-derived, colostrum-deprived pig model. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 11-20.

Hall, W., Neumann, E. (2013). Fresh Pork and Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Factors Related to the Risk of Disease Transmission. *Transboundary and Emerging Diseases*, 1-17.

Hanada, K., Suzuki, Y., Nakane, T., Hirose, O., Gojobori, T. (2005). The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Mol. Biol. Evol.* 22, 1024-1031.

Hermann, JR., Muñoz-Zanzi, CA., Roof, MB., Burkhart, K., Zimmerman, JJ. (2005). Probability of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection as a function of exposure route and dose. *Vet. Microbiol.* 110, 7-16.

Hesse, RA., Couture, LP., Lau, ML., Dimmick, SK., Ellsworth, SR. (1996a). Efficacy of Prime Pc PRRS in controlling PRRS reproductive disease: Homologous challenge. In: *Proc. 27th Ann. Meet Am Assoc Swine Pract.*, pp. 103-106.

Hesse, RA., Couture, LP., Lau, ML., Wunder, KK., Wasmoen, TL. (1996b). Efficacy of Prime Pc PRRS in controlling PRRS reproductive disease: Heterologous challenge. In: *Proc. 27th Ann. Meet Am Assoc Swine Pract.*, pp. 107-110.

Hesse, RA., Couture, LP., Lau, ML., Wasmoen, TL., Doster, AR., Cooper, VL. (1997). Efficacy of Prime Pac PRRS® in controlling PRRS respiratory disease: homologous and heterologous challenge. En: *Proc. 28th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, Québec, Canadá. pp. 137-144.

Hirose, O., Shibata, I., Kudou, H., Samegai, Y., Yoshizawa, S., Ono, M., Nishimura, M., Hiroike, T., Kageyama, K., Sakano, T. (1995). Experimental infection of SPF piglets with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) viruses isolated from two farms. *J. Vet. Med. Sci.* 57, 991-995.

Hoffmann, E., Mahmood, K., Chen, Z., Yang, CF., Spaete, J., Greenberg, HB., Herlocher, ML., Jin, H., Kemble, G. (2005). Multiple gene segments control the temperature sensitivity and attenuation phenotypes of ca B/Ann Arbor/1/66. *J. Virol.* 79, 11014-11021.

Hopper, SA., White, ME., Twiddy, N. (1992). An outbreak of blue-eared pig disease (porcine reproductive and respiratory syndrome) in four pig herds in Great Britain. *Vet. Rec.* 131, 140-144.

Horter, DC., Pogranichniy, RM., Chang, CC., Evans, RB., Yoon, KJ., Zimmerman, JJ. (2002). Characterization of the carrier state in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet. Microbiol.* 86, 213-228.

- Hutchinson, D., Hesse, R., Wasmoen, T.** (1997). Evaluation of semen quality and virus shedding in boars vaccinated with PrimePac and challenged with virulent PRRS virus. En: *Proc. 28th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, Québec, Canada. pp. 145-148.
- Indik, S., Valíček, L., Klein, D., Klánová.** (2000). Variations in the major envelope glycoprotein GP5 of Czech strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 81, 2497-2502.
- Jeong, HJ., Song, YJ., Lee, SW., Lee, JB., Park, SY., Song, CS., Ha, GW., Oh, JS., Oh, YK., Choi, IS.** (2010). Comparative measurement of cell-mediated immune response of swine to the M and N proteins of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV). *Clin. Vaccine Immunol.* 503-512.
- Jiang, P., Jiang, W., Li, Y., Wu, S., Xu, J.** (2004). Humoral immune response induced by oral administration of *S. typhimurium* containing a DNA vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 321-328.
- Jiang, W., Jiang, P., Li, Y., Tang, J., Wang, X., Ma, S.** (2006). Recombinant adenovirus expressing GP5 and M fusion proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus induce both humoral and cell-mediated immune responses in mice. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 113, 169-180.
- Jiang, W., Jiang, P., Wang, X., Li, Y., Wang, X., Du, Y.** (2007a). Influence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 glycoprotein N-linked glycans on immune responses in mice. *Virus Genes* 35, 663-671.
- Jiang, W., Jiang, P., Li, Y., Wang, X., Du, Y.** (2007b). Analysis of immunogenicity of minor envelope protein GP3 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mice. *Virus Genes* 35, 695-704.
- Johnson, W., Roof, M., Vaughn, E., Christopher-Hennings, J., Johnson, CR., Murtaugh, MP.** (2004). Pathogenic and humoral immune responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are related to viral load in acute infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 233-247.
- Johnson, CR., Yu, W., Murtaugh, MP.** (2007). Cross-reactive antibody responses to nsp1 and nsp2 of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 88, 1184-1195.
- Johnson, CR., Griggs, TF., Gnanandarajah, J., Murtaugh, MP.** (2011). Novel structural protein in porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by an alternative ORF5 present in all arteriviruses. *J. Gen. Virol.* 92, 1107-1116.
- Joo, HS., Yoon, IJ.** (1994). Virologic, serologic and pathogenic differences of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) virus isolates. *Proc. 13th IPVS congress.*, Bangkok, Thailand. p.57.

- Kang, Y., Shin, J., Kim, Y., Kang, YB., Shin, JH., Kim, YJ., Poomvises, P., Ingkaninun, P.** (1994). PRRS: seroepidemiology of indirect fluorescent antibodies in selected pig breeding farms in Korea. *Proceedings: The 13th International Pig Veterinary Society Congress*, Bangkok, Thailand.
- Karniychuk, UU., Nauwynck, HJ.** (2009). Quantitative changes of sialoadhesin and CD163 positive macrophages in the implantation sites and organs of porcine embryos/fetuses during gestation. *Placenta* 30, 497-500.
- Karniychuk, UU., Geldhof, M., Vanhee, M., Van Doorselaere, J., Saveleva, TA., Nauwynck, HJ.** (2010). Pathogenesis and antigenic characterization of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate. *BMC Vet Res.* 6, 30.
- Karniychuk, UU., Saha, D., Geldhof, M., Vanhee, M., Cornillie, P., Van den Broeck, W., Nauwynck, HJ.** (2011). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) causes apoptosis during its replication in fetal implantation sites. *Microb. Pathog.* 51, 194-202.
- Käser, T., Gerner, W., Hammer, S.E., Patzl, M., Saalmüller, A.** (2008). Detection of Foxp3 protein expression in porcine T lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 125, 92-101.
- Katz, JB., Shafer, AL., Eernisse, KA., Landgraf, JG., Nelson, EA.** (1995). Antigenic differences between European and American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are encoded by the carboxyterminal portion of open reading frame 3. *Vet. Microbiol.* 44, 65-76.
- Keffaber, KK.** (1989). Reproductive failure of unknown etiology. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.* 1, 1-10.
- Key, KF., Haqshenas, G., Guenette, DK., Swenson, SL., Toth, TE., Meng, XJ.** (2001). Genetic variation and phylogenetic analyses of the ORF5 gene of acute porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet. Microbiol.* 83, 249-263.
- Key, KF., DiCristina, J., Gillespie, J., Guenette, DK., Meng, XJ.** (2007). Direct inoculation of RNA transcripts from an infectious cDNA clone of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) into the lymph nodes and tonsils of pigs initiates PRRSV infection in vivo. *Arch. Virol.* 152, 1383-1387.
- Kim, HS., Kwang, J., Yoon, KJ., Frey, ML.** (1993). Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch. Virol.* 133, 477-483.
- Kim, WI., Lee, DS., Johnson, W., Roof, M., Cha, SH., Yoon, KJ.** (2007). Effect of genotypic and biotypic differences among PRRS viruses on the serologic assessment of pigs for virus infection. *Vet. Microbiol.* 123, 1-14.
- Kim, WI., Yoon, KJ.** (2008). Molecular assessment of the role of envelope-associated structural proteins in cross neutralization among different PRRS viruses. *Virus Genes.* 37, 380-391.

- Kim, SH., Roh, IS., Choi, EJ., Lee, C., Lee, CH., Lee, KH., Lee, KK., Song, YK., Lee, OS., Park, CK.** (2009). A molecular analysis of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolated in South Korea. *Vet. Microbiol.* 143, 394-400.
- Kimman, TG., Cornelissen, LA., Moormann, RJ., Rebel, JM., Stockhofe-Zurwieden, N.** (2009). Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology. *Vaccine* 27, 3704-3718.
- Kranker, S., Nielsen, J., Bille-Hansen, V., Bøtner, A.** (1998). Experimental inoculation of swine at various stages of gestation with a Danish isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet. Microbiol.* 61, 21-31.
- Kreutz, LC., Ackermann, MR.** (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus enters cells through a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus Res.* 42, 137-147.
- Kreutz, LC., Mengeling, WL.** (1997). Baculovirus expression and immunological detection of the major structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 59, 1-13.
- Kritas, SK., Alexopoulos, C., Saoulidis, K., Kyriakis, SC.** (1999). Clinical protection conferred to fattening pigs by a live vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome (Porcine PRRS, Intervet) under field conditions. In: *Proc. of 3rd International symp. on PRRS and Aujeszky's Diseases*, Ploufragan, Francia. p. 267.
- Kuwahara, H., Nunoya, T., Tajima, M., Kato, A., Samejima, T.** (1994). An outbreak of porcine reproductive and respiratory syndrome in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 56, 901-909.
- Kwang, J., Zuckermann, F., Ross, G., Yang, S., Osorio, F., Liu, W., Low, S.** (1999). Antibody and cellular immune responses of swine following immunisation with plasmid DNA encoding the PRRS virus ORF's 4, 5, 6 and 7. *Res. Vet. Sci.* 67, 197-199.
- Kwon, B., Ansari, IH., Osorio, FA., Pattnaik, AK.** (2006). Infectious clone-derived viruses from virulent and vaccine strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus mimic biological properties of their parental viruses in a pregnant sow model. *Vaccine* 24, 7071-7080.
- Kwon, B., Ansari, IH., Pattnaik, AK., Osorio, FA.** (2008). Identification of virulence determinants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through construction of chimeric clones. *Virology* 380, 371-378.
- Labarque, GG., Nauwynck, HJ., Van Woensel, PAM., Visser, N., Pensaert, M.** (2000b). Efficacy of an American and a European serotype PRRSV vaccine after challenge with American and European wild-type strains of the virus. *Vet. Res.* 31, 97.
- Labarque, GG., Van Gucht, S., Van Reeth, K., Nauwynck, H., Pensaert, M.** (2003a). Respiratory tract protection upon challenge of pigs vaccinated with attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines. *Vet. Microbiol.* 95, 187-197.

Labarque, G., Van Gucht, S., Nauwynck, H., Van Reeth, K., Pensaert, M. (2003b). Apoptosis in the lungs of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and associations with the production of apoptogenic cytokines. *Vet. Res.* 34, 249-260.

Labarque, G., Van Reeth, KV., Nauwynck, H., Drexler, C., Van Gucht, S., Pensaert, M. (2004). Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain on vaccine efficacy. *Vaccine* 22, 4183-4190.

Lager, KM., Ackerman, MR. (1994). Pulmonary lesions in fetuses exposed in utero to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 480-483.

Lager, KM., Mengeling, WL., Brockmeier, SL. (1994). Consequences of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome virus (PEARSV) infection in bred gilts at different stages of gestation. En: *Proc. 13th IPVS Congress*, Bangkok, Thailand. p. 55.

Lager, KM., Halbur, PG. (1996). Gross and microscopic lesions in porcine fetuses infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 275-282.

Lager, KM., Mengeling, WL., Brockmeier, SL. (1996a). Pathogenesis of fetal porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection during early and late gestation. En: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bologna, Italia. p. 55

Lager, KM., Mengeling, WL., Brockmeier, SL. (1996b). Effect of post-coital intrauterine inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on conception in gilts. *Vet. Rec.* 138, 227-228.

Lager, KM., Mengeling, WL. (1997a). Current status of vaccines and vaccination for porcine reproductive and respiratory syndrome. En: *Proc 28th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, Québec, Canada. pp. 443-446.

Lager, KM., Mengeling, WL., Brockmeier, SL. (1997b). Homologous challenge of porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine. *Vet. Microbiol.* 58, 113-125.

Lager, KM., Mengeling, WL., Brockmeier, SL. (1999). Evaluation of protective immunity in gilts inoculated with the NADC-8 isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and challenge-exposed with an antigenically distinct PRRSV isolate. *Am. J. Vet. Res.* 60, 1022-1027.

Lager, KM., Mengeling, WL., Wesley, RD. (2002). Evidence for local spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Swine Health and Production*, 10, 167-170.

Lager, KM., Mengeling, WL., Wesley, RD. (2003). Strain predominance following exposure of vaccinated and naive pregnant gilts to multiple strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.* 67, 121-127.

Lamontagne, L., Pagé, C., Larochelle, R., Magar, R. (2003). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus persistence in blood, spleen, lymph nodes, and tonsils of

experimentally infected pigs depends on the level of CD8^{high} T cells. *Viral Immunol.* 16, 395-406.

Larochele, R., Sauvageau, R., Magar, R. (1994). Immunohistochemical detection of swine influenza virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia cases from Québec. *Can. J. Vet.* 35, 513-515.

Larochele, R., Mardassi, H., Dea, S., Magar, R. (1996). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in cell cultures and formalin-fixed tissues by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 3-10.

Lawson, SR., Rossow, KD., Collins, JE., Benfield, DA., Rowland, RR. (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of gnotobiotic pigs: sites of virus replication and co-localization with MAC-387 staining at 21 days post-infection. *Virus Res.* 51, 105-113.

Le Gall, AL., Albina, E., Magar, R., Gauthier, JP. (1997). Antigenic variability of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolates: influence of virus passage in pig. *Virus Res.* 28, 247-257.

Le Gall, AL., Legeay, O., Bourhy, H., Arnauld, C., Albina, E., Jestin, A. (1998). Molecular variation in the nucleoprotein gene (ORF7) of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Res.* 54, 9-21.

Lee, C., Bachand, A., Murtaugh, MP., Yoo, D. (2004a). Differential host cell gene expression regulated by the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP4 and GP5 glycoproteins. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 189-198.

Lee, C., Rogan, D., Erickson, L., Zhang, J., Yoo, D. (2004b). Characterization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus glycoprotein 5 (GP5) in stably expressing cells. *Virus Res.* 104, 33-38.

Lee, SM., Kleiboeker, SB. (2005). Porcine arterivirus activates the NF-kappaB pathway through IkappaB degradation. *Virology* 342, 47-59.

Lee, C., Kim, H., Kang, B., Yeom, M., Han, S., Moon, H., Park, S., Kim, H., Song, D., Park, B. (2010). Prevalence and phylogenetic analysis of the isolated type I porcine reproductive and respiratory syndrome virus from 2007 to 2008 in Korea. *Virus Genes* 40, 25-30.

Li, Y., Wang, X., Bo, K., Wang, X., Tang, B., Yang, B., Jiang, W., Jiang, P. (2007). Emergence of a highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the Mid-Eastern region of China. *Vet. J.* 174, 577-584.

Li, B., Fang, L., Xu, Z., Liu, S., Gao, J., Jiang, Y., Chen, H., Xiao, S. (2009). Recombination in vaccine and circulating strains of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 2032-2035.

Lindhaus, W., Lindhaus, B. (1991). Mystery swine disease. *Praktische Tierarzt* 72, 423-425.

- Liu, CH., Chaung, HC., Chang, HL., Peng, YT., Chung, WB.** (2009). Expression of Tolllike receptor mRNA and cytokines in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 136, 266-276.
- Liu, Y., Shi, W., Zhou, E., Wang, S., Hu, S., Cai, X., Rong, F., Wu, J., Xu, M., Xu, M., Li, L.** (2010). Dynamic changes in inflammatory cytokines in pigs infected with highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17, 1439-1445.
- Loemba, HD., Mounir, S., Mardassi, H., Archambault, D., Dea, S.** (1996). Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch. Virol.* 141, 751-761.
- López, OJ., Osorio, FA.** (2004). Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity. *Vet. Imm. Immunopathol.* 102, 155-163.
- López-Fuertes, L., Domenech, N., Álvarez, B., Ezquerra, A., Domínguez, J., Castro, JM., Alonso, F.** (1999). Analysis of cellular immune response of pigs recovered from porcine respiratory and reproductive syndrome infection. *Virus Res.* 64, 33-42.
- López-Fuertes, L., Campos, E., Doménech, N., Ezquerra, A., Castro, JM., Domínguez, J., Alonso, F.** (2000). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus down-modulates TNF-alpha production in infected macrophages. *Virus Res.* 69, 41-46.
- Loula, TJ.** (1991). Mystery pig disease. *Agri. Practice* 12, 23-34.
- Loving, CL., Brockmeier, SL., Sacco, RE.** (2007). Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus. *Immunology* 120, 217-229.
- Luo, R., Xiao, S., Jiang, Y., Jin, H., Wang, D., Liu, M., Chen, H., Fang, L.** (2008). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) suppresses interferonbeta production by interfering with the RIG-I signaling pathway. *Mol. Immunol.* 45, 2839-2846.
- Magar, R., Larochelle, R., Robinson, Y., Dubuc, C.** (1993). Immunohistochemical detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using colloidal gold. *Can. J. Vet. Res.* 57, 300-304.
- Magar, R., Larochelle, R., Dea, S., Gagnon, EA., Nelson, EA., Christopher-Hennings, J., Benfield, DA.** (1995). Antigenic comparison of canadian and US isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using monoclonal antibodies to the nucleocapsid protein. *Can. J. Vet. Res.* 59, 232-234.
- Magar, R., Larochelle, R., Nelson, EA., Gharreyre, C.** (1997). Differential reactivity of a monoclonal antibody directed to the membrane protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.* 61, 69-71.
- Magar, R., Larochelle, R.** (2004). Evaluation of the presence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pig meat and experimental transmission following oral exposure. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 68, 259-266.

Mardassi, H., Mounir, S., Dea, S. (1995). Molecular analysis of the ORFs3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Québec reference strain. *Arch. Virol.* 140, 1405-1418.

Martínez-Lobo, FJ., Díez-Fuertes, F., Mogedas, M., Simarro, I., García, C., Castro, JM., Prieto, C. (2008). Evaluation of the safety and virus transmissibility of porcine reproductive and respiratory syndrome MLV vaccine strains in nursery pigs. In: *Proc. 20th International Pig Veterinary Congress*, Durban, South Africa.

Martínez-Lobo, FJ., Díez-Fuertes, F., Segalés, J., García- Artiga, C., Simarro, I., Castro, JM., Prieto, C. (2011a). Comparative pathogenicity of type 1 and type 2 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a young pig infection model. *Vet. Microbiol.* 154, 58-68.

Martínez-Lobo, FJ., Díez-Fuertes, F., Simarro, I., Castro, JM., Prieto, C. (2011b). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus isolates differ in their susceptibility to neutralization. *Vaccine* 29, 6928-6940.

Mateu, E., Díaz, I., Darwich, L., Casal, J., Martín, M., Pujols, J. (2006). Evolution of ORF5 of Spanish porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains from 1991 to 2005. *Virus Res.* 115, 198-206.

Mateusen, B., Van Soom, A., Maes, DG., Favoreel, H., Nauwynck, HJ. (2007). Receptor-determined susceptibility of preimplantation embryos to pseudorabies virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Biol. Reprod.* 76, 415-423.

Matsumura, K., Watanabe, Y., Imai-Matsumura, K., Connolly, M., Koyama, Y., Onoe, H., Watanabe, Y. (1992). Mapping of prostaglandin E2 binding sites in rat brain using quantitative autoradiography. *Brain Res.* 581, 292-298.

Mavromatis, I., Kritas, SK., Alexopoulos, C., Tsinas, A., Kyriakis, C. (1999). Field evaluation of a live vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome in fattening pigs. *J. Vet. Med.* 46, 603-612.

McCaw, M., (2000). Effect of reducing crossfostering at birth on piglet mortality and performance during an acute outbreak of porcine reproductive and respiratory syndrome. *J. Swine Health Prod.* 8, 15-21.

Medveczky, I., Kulcsár, G., Makranszki, L., Glávits, R., Gorcyca, D., Schütz, B. (2002). Efficacy of a PRRS modified live virus vaccine (US-strain) against the heterologous infection by a virulent PRRS virus (EU-strain): reproductive performance. En: *17th Congress of the International Pig Veterinary Society*, EEUU, pp 552.

Meier, WA., Galeota, J., Osorio, FA., Husmann, RJ., Schnitzlein, WM., Zuckermann, FA. (2003). Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology* 309, 18-31.

Meldrum, KC. (1991). New pig disease. *Vet. Rec.* 128, 483.

Meng, XJ., Paul, PS., Halbur, PG. (1994). Molecular cloning and nucleotide sequencing of the 3' terminal genomic RNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 75, 1795-1801.

Meng, XJ., Paul, PS., Halbur, PG., Morozov, I. (1995a). Sequence comparison of open reading frames 2 to 5 of low and high virulence United States isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 76, 3181-3188.

Meng, XJ., Paul, PS., Halbur, PG., Lum, MA. (1995b). Phylogenetic analyses of the putative M (ORF6) and N (ORF7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the U.S.A. and Europe. *Arch. Virol.* 140, 745-755.

Meng, XJ., Paul, PS., Halbur, PG., Lum, MA. (1996a). Characterization of a high-virulence U.S. isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a continuous cell line, ATCC CRL11171. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 374-381.

Meng, XJ. (2000). Heterogeneity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for current vaccine efficacy and future vaccine development. *Vet. Microb.* 74, 309-329.

Mengeling, WL., Lager, KM., Vorwald, AC. (1994). Temporal characterization of transplacental infection of porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am. J. Vet. Res.* 55, 1391-1398.

Mengeling, WL., Lager, KM., Vorwald, AC. (1996a). An overview on vaccination for porcine reproductive and respiratory syndrome. En: *Proc. AD Leman Swine Conf.*, St. Paul, Minnesota, USA. pp. 139-142.

Mengeling, WL., Lager, KM., Vorwald, AC. (1996b). Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome using infected alveolar macrophages collected from live pigs. *Vet. Microbiol.* 49, 105-115.

Mengeling, WL., Vorwald, AC., Lager, KM., Brockmeier, SL. (1996c). Comparison among strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus for their ability to cause reproductive failure. *Am. J. Vet. Res.* 57, 834-839.

Mengeling, WL., Lager, KM., Vorwald, AC. (1998). Clinical consequences of exposing pregnant gilts to strains of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolated from field cases of "atypical" PRRS. *Am. J. Vet. Res.* 59, 1540-1544.

Mengeling, WL., Lager, KM., Vorwald, AC. (1999a). Safety and efficacy of vaccination of pregnant gilts against porcine reproductive and respiratory syndrome. *Am. J. Vet. Res.* 60, 796-801.

Mengeling, WL., Vorwald, AC., Lager, KM., Clouser, DF., Wesley, RD. (1999b). Identification and clinical assessment of suspected vaccine-related field strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am. J. Vet. Res.* 60, 334-340.

- Mengeling, WL., Lager, KM.** (2000). A brief review of procedures and potential problems associated with the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet. Res.* 31, 61-69.
- Mengeling, WL., Lager, KM., Vorwald, AC., Clouser, DF.** (2003a). Comparative safety and efficacy of attenuated single-strain and multi-strain vaccines for porcine reproductive and respiratory syndrome. *Vet. Microbiol.* 93, 25-38.
- Meulenberg, JJM., Besten, AP., De Kluyver, E., Moormann, RJM., Schaaper, WMM., Wensvoort, G.** (1995). Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology* 206, 155-163.
- Meulenberg, JJM., Besten, AP.** (1996). Identification and characterization of a sixth structural protein of lelystad virus: the glycoprotein GP2 encoded by ORF2 is incorporated in virus particles. *Virology* 225, 44-51.
- Meulenberg, JJM., Van Nieuwstadt, AP., Van Essen-Zandbergen, A., Langeveld, JPM.** (1997). Posttranslational processing and identification of a neutralization domain of the GP4 protein encoded by ORF4 of Lelystad virus. *J. Virol.* 71, 6061-6067.
- Miguel, JC., Chen, J., Van Alstine, WG., Johnson, RW.** (2010). Expression of inflammatory cytokines and Toll-like receptors in the brain and respiratory tract of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 135, 314-319.
- Miller, LC., Laegreid, WW., Bono, JL., Chitko-McKown, CG., Fox, JM.** (2004). Interferon type I response in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected MARC-145 cells. *Arch. Virol.* 149, 2453-2463.
- Miller, LC., Lager, KM., Kehrli, ME.** (2009). Role of Toll-like receptors in activation of porcine alveolar macrophages by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 360-365.
- Molina, RM., Cha, SH., Chittick, W., Lawson, S., Murtaugh, MP., Nelson, EA., Christopher-Hennings, J., Yoon, KJ., Evans, R., Rowland, RR., Zimmerman, JJ.** (2008). Immune response against porcine reproductive and respiratory syndrome virus during acute and chronic infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 126, 283-292.
- Molitor, T., Leitner, G., Choi, C., Risdahl, J., Rossow, K., Collins, J.** (1992). Modulation of host immune responses by SIRS virus. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.* 4, 27-28.
- Molitor, TW.** (1993). Immune response to PRRS virus. In: *A.D. Leman Swine Conf.*, St.Paul, USA. pp. 49-50.
- Moon, RD.** (2002). Muscid flies, Muscidae. In: Durden LA, Mullen GR, eds. *Medical and Veterinary Entomology*. New York: Academic Press, 279-301.
- Morgan, SB., Graham, SP., Salguero, FJ., Sánchez Cordon, PJ., Mokhtar, H., Rebel, JM., Weesendorp, E., Bodman-Smith, KB., Steinbach, F., Frossard, JP.** (2011). Increased

pathogenicity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus is associated with enhanced adaptive responses and viral clearance. *Vet. Microbiol.* 163, 13-22.

Morozov, I., Meng, XJ., Paul, PS. (1995). Sequence analysis of open reading frames (ORFs) 2 to 4 of a U.S. isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch. Virol.* 140, 1313-1319.

Mortensen, S., Sogaard, R. (1999). PRRS clinical signs in sow herds after onset of PRRS-vaccination. En: *Proc. 3rd International Symposium on PRRS and Aujeszky's Disease*, Ploufragan, France, pp.271-272.

Mortensen, S., Stryhn, H., Sogaard, R., Boklund, A., Stärk, KDC., Christensen, J., Willeberg, P. (2002). Risk factors for infection of sow herds with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Preventive Veterinary Medicine*, 53, 83-101.

Mulupuri, P., Zimmerman, JJ., Hermann, J., Johnson, CR., Cano, JP., Yu, W., Dee, SA., Murtaugh, MP. (2008). Antigen-specific B-cell responses to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J. Virol.* 82, 358-370.

Murtaugh, MP., Elam, MR., Kakach, LT. (1995). Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch. Virol.* 140, 1451-60.

Murtaugh, MP., Xiao, Z., Zuckermann, F. (2002). Immunological responses of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunol.* 15, 533-547.

Murtaugh, M. (2009). Update on PRRSV immunology and viral genetics: From hopeless to hopeful. En: *40th Amer.Assoc.Swine.Vet.* Dallas. EE.UU. p.459.

Nam, E., Park, CK., Kim, SH., Joo, YS., Yeo, SG., Lee, C. (2009). Complete genomic characterization of a European type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate in Korea. *Arch. Virol.* 154, 629-638.

Nathues, C., Perler, L., Bruhn, S., Suter, D., Eichhorn, L., Hofmann, M., Nathues, H., Baechlein, C., Ritzmann, M., Palzer, A., Grossmann, K., Schüpbach-Regula, G., Thür, B. (2014). An outbreak of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Switzerland Following Import of Boar Semen. *Transboundary and Emerging Diseases*.

National Pork Producers (2000). Washington DC. <http://www.porkscience.org/documents/other/positionprrs.pdf>.

Nauwynck, HJ., Duan, X., Favoreel, HW., Van Oostveldt, P., Pensaert, MB. (1999). Entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages via receptor-mediated endocytosis. *J. Gen. Virol.* 80, 297-305.

Nelsen, CJ., Murtaugh, MP., Faaberg, KS. (1999). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J. Virol.* 73, 270-280.

Nelson, EA., Christopher-Hennings, LL., Harris, JE., Collins, DW., Chladek, DE., Gorcyca, DA., Benfield, DA. (1992). Preliminary characterization of monoclonal antibodies to a United States isolate (ATCC VR) of porcine epidemic abortion and respiratory virus. In: *Proc 12th IPVS Congress*, La Haya, Holanda. pp. 121-122.

Nelson, EA., Christopher-Hennings, J., Drew, T., Wensvoort, G., Collins, JE., Benfield, DA. (1993). Differentiation of US and European isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.* 31, 3184-3189.

Nelson, EA., Christopher-Hennings, JT., Benfield, DA. (1994). Serum immune response to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 410-415.

Nielsen, TL., Nielsen, J., Have, P., Bækbo, P., Hoff-Jørgensen, R., Bøtner, A. (1997). Examination of virus shedding in semen from vaccinated and from previously infected boars after experimental challenge with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microb.* 54, 101-112.

Nielsen, HS., Oleksiewicz, MB., Forsberg, R., Stadejek, T., Bøtner, A., Storgaard, T. (2001). Reversion of a live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine investigated by parallel mutations. *J. Gen. Virol.* 82, 1263-1272.

Nielsen, J., Bøtner, A., Bille-Hansen, V., Oleksiewicz, MB., Storgaard, T. (2002). Experimental inoculation of late term pregnant sows with a field isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome vaccine-derived virus. *Vet. Microb.* 84, 1-13.

Nilubol, D., Thacker, BJ., Harris, DL., Thacker, EL. (2003). PRRSV vaccination study: Interleukin-12 to enhance killed vaccine immunity and combined vaccination with modified live and killed vaccines. In: *Proc. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases*, Roma, Italia, pp. 113-114.

Nodelijk, G., De Jong, MCM., Van Nes, A., Vernooy, JCM., Van Leengoed, LAMG., Pol, JMA., Verheijden, JHM. (2000). Introduction, persistence and fade-out of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a Dutch breeding herd: a mathematical analysis. *Epidemiology and Infection*, 124, 173-182.

Nodelijk, G., De Jong, MCM., Van Leengoed, LAMG., Wensvoort, G., Pol, JMA., Steverink, PJGM., Verheijden, JHM. (2001). A quantitative assessment of the effectiveness of PRRSV vaccination in pigs under experimental conditions. *Vaccine*, 19, 3636-3644.

Ohlinger, VF., Weiland, F., Haas, B., Visser, N., Ahl, R., Mettenleiter, TC., Weiland, E., Rziha, HJ., Saalmuller, A., Straub, OC. (1991). Aetiological studies of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Tierärztliche Umschau* 46, 703-704.

Ohlinger, VF. (1992). PRRS antibodies were present in E. Germany in 1988/9. *PDIC Newslett.*, 1 diciembre.

Oleksiewicz, MB., Bøtner, A., Madsen, KG., Storgaard, T. (1998). Sensitive detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes. *Vet. Microbiol.* 64, 7-22.

Oleksiewicz, MB., Bøtner, A., Toft, P., Normann, P., Storgaard, T. (2001). Epitope mapping porcine reproductive and respiratory syndrome virus by phage display: the nsp2 fragment of the replicase polyprotein contains a cluster of B-cell epitopes. *J. Virol.* 75, 3277-3290.

Opriessnig, T., Halbur, PG., Yoon, KJ., Pogranichniy, RM., Harmon, KM., Evans, R., Key, KF., Pallares, FJ., Thomas, P., Meng, XJ. (2002). Comparison of molecular and biological characteristics of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine (ingelvac PRRS MLV), the parent strain of the vaccine (ATCC VR2332), ATCC VR2385, and two recent field isolates of PRRSV. *J. Virol.* 76, 11837-11844.

Oslage, U., Dahle, J., Müller, T., Kramer, M., Beier, D., & Liess, B. (1994). Prevalence of antibodies against the viruses of European swine fever, Aujeszky's disease and porcine reproductive and respiratory syndrome in wild boars in the federal states Sachsen-Anhalt and Brandenburg. *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 101(1), 33-38.

Osorio, FA., Zuckermann, F., Wills, R., Meier, W., Christian, S., Galeota, J., Doster, A. (1998). PRRSV: Comparison of commercial vaccines in their ability to induce protection against current PRRSV strains of high virulence. En: *Allen D. Leman Swine Conference*, pp. 176-182.

Ostrowski, M., Galeota, JA., Jar, AM., Platt, KB., Osorio, FA., Lopez, O. (2002). Identification of neutralizing and nonneutralizing epitopes in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 ectodomain. *J. Virol.* 76, 4241-4250.

Otake, S., Dee, SA., Rossow, KD., Joo, HS., Deen, J., Molitor, TW., Pijoan, C. (2002a). Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by needles. *Vet. Rec.* 150, 114-115.

Otake, S., Dee, SA., Rossow, KD., Moon, RD., Trincado, C., Pijoan, C. (2003a). Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by houseflies (*Musca domestica*). *Vet. Rec.* 152, 73-76.

Otake, S., Dee, SA., Moon, RD., Rossow, KD., Trincado, C., Pijoan, C. (2003b). Evaluation of mosquitoes, *Aedes vexans*, as biological vectors of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.* 67, 265-270.

Otake, S., Dee, SA., Moon, RD., Rossow, KD., Trincado, C., Farnham, M., Pijoan, C. (2003c). Survival of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in houseflies. *Can. J. Vet. Res.* 67, 198-203.

Otake, S., Dee, SA., Moon, RD., Rossow, KD., Trincado, C., Pijoan, C. (2004). Studies on the carriage and transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by individual houseflies (*Musca domestica*). *The Veterinary Record*, 154, 80-85.

- Papatsiros, VG., Alexopoulos, C., Kritas, SK., Koptopoulos, G., Nauwynck, HJ., Pensaert, MB., Kyriakis, SC.** (2006). Long-term administration of a commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-inactivated vaccine in PRRSV-endemically infected sows. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health*. 53, 266-272.
- Park, BK., Joo, HS., Dee, SA., Pijoan, C.** (1995). Evaluation of an indirect fluorescent IgM antibody test for the detection of pigs with recent infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 7, 544-546.
- Park, BK., Yoon, IJ., Joo, HS.** (1996). Pathogenesis of plaque variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pregnant sows. *Am. J. Vet. Res.* 57, 320-323.
- Park, BK., Kim, SJ., Chi, YT., Park, CS.** (1996b). Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome by *in situ* hybridization with non-radioactive probes. In: *Proc. 1th IPVS Congress*, Bologna, Italia. p.81.
- Pei, Y., Hodgins, DC., Lee, C., Calvert, JG., Welch, SK., Jolie, R., Keith, M., Yoo, D.** (2008). Functional mapping of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus capsid protein nuclear localization signal and its pathogenic association. *Virus Res.* 135, 107-114.
- Pejsak, Z., Stadejek, T., Kolodziejczyk, P.** (2000). Effects of vaccination against PRRS on reduction of respiratory infections in grower-finisher pigs. En: *16th International Pig Veterinary Society Congress*, Melbourne, Australia, p. 600.
- Peng, YT., Chaung, HC., Chang, HL., Chang, HC., Chung, WB.** (2009). Modulations of phenotype and cytokine expression of porcine bone marrow-derived dendritic cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 136, 359-365.
- Perlman, S., Netland, J.** (2009). Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 439-450.
- Pesch, S., Meyer, C., Ohlinger, VF.** (2005). New insights into the genetic diversity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet. Microbiol.* 107, 31-48.
- Piras, F., Bollard, S., Laval, F., Joisel, F., Reynaud, G., Charreyre, C., Andreoni, C., Juillard, V.** (2005). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus-specific interferon-gamma(+) T-cell responses after PRRS virus infection or vaccination with an inactivated PRRS vaccine. *Viral Immunol.* 18, 381-389.
- Pirzadeh, B., Dea, S.** (1997). Monoclonal antibodies to the ORF5 product of porcine reproductive and respiratory syndrome virus define linear neutralizing determinants. *J. Gen. Virol.* 78, 1867-1873.
- Pirzadeh, B., Dea, S.** (1998). Immune response in pigs vaccinated with plasmid DNA encoding ORF5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 79, 989-999.
- Pirzadeh, B., Gagnon, CA., Dea, S.** (1998). Genomic and antigenic variations of porcine reproductive and respiratory syndrome virus major envelope GP5 glycoprotein. *Can. J. Vet. Res.* 62, 170-177.

Plagemann, PGW. (2004a). The primary GP5 neutralization epitope of North American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 263-275.

Plagemann, PGW. (2004b). GP5 ectodomain epitope of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, strain Lelystad virus. *Virus Res.* 102, 225-230.

Plagemann, PG. (2006). Neutralizing antibody formation in swine infected with seven strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as measured by indirect ELISA with peptides containing the GP5 neutralization epitope. *Viral Immunol.* 19, 285-293.

Plana, J., Vayreda, M., Vilarrasa, J., Bastons, M., Rosell, R., Martinez, M., San Gabriel, A., Pujols, J., Badiola, JL., Ramos, JA., Domingo, M. (1992). Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease). Isolation in Spain of the causative agent and experimental reproduction of the disease. *Vet. Microb.* 33, 203-211.

Plana-Durán, J., Climent, I., Sarraseca, J., Urniza, A., Cortés, E., Vela, C., Casal, JI. (1997a). Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain Olot/91. Involvement of ORF3 and ORF5 proteins in protection. *Virus Genes* 14, 19-29.

Plana-Durán, J., Bastons, M., Urniza, A., Vayreda, M., Vilà, X., Mañé, H. (1997b). Efficacy of an inactivated vaccine for prevention of reproductive failure induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microb.* 55, 361-370.

Plana-Durán, J., Mouriño, M., Viaplana, E., Balasch, M., Casal, I., Rodríguez, MJ., Enjuanes, L., Izeta, A., Alonso, S., Solá, I. (2000). New strategies in the development of PRRS vaccines. Subunit vaccines and self-limiting vectors, based on defective coronaviruses. *Vet. Res.* 31, 41-12.

Pol, JMA., Van Dijk, JE., Wensvoort, G., Tepstra, C. (1991). Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)). *Vet.Q.* 13, 137-143.

Pol, JMA., Wagenaar, F. (1992). Morphogenesis of Lelystad virus in porcine lung alveolar macrophages. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.* 4, 29.

Pol, JMA., Wagenaar, F., Reus, JEG. (1997). Comparative morphogenesis of three PRRS virus strains. *Vet. Microb.* 55, 203-208.

Polson, DD. (1996). Effective PRRS control: what the Americans are doing wrong and right. *The Pig J. Proc.* pp. 110-129.

Polson, D., Hartsook, G., Dion, K. (2010). McRebel as a key component for the successful elimination of PRRS virus from very large swine breeding herds. *Int. Pig Vet. Soc. Cong.* p. 267.

Prieto, C., Suarez, P., Martin-Rillo, S., Simarro, I., Solana, A., Castro, JM. (1996a). Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on development of porcine fertilized ova in vitro. *Theriogenology* 46, 687-693.

- Prieto, C., Suarez, P., Simarro, I., García, C., Martín Rillo, S., Castro, JM.** (1996b). Semen changes in boars alter experimental infection with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Theriogenology* 45, 383-395.
- Prieto, C., Suarez, P., Simarro, I., García, C., Fernandez, A., Castro, JM.** (1997a). Transplacental infection following exposure of gilts to porcine reproductive and respiratory syndrome virus at the onset of gestation. *Vet. Microbiol.* 57, 301-311.
- Prieto, C., Suárez, P., Simarro, I., García, C., Martín-Rillo, S., Castro, JM.** (1997b). Insemination of susceptible and preimmunized gilts with boar semen containing porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology*. 47, 647-654.
- Prieto, C., García, C., Simarro, I., Castro, JM.** (2003). Temporal localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in reproductive tissues of experimentally infected boars. *Theriogenology*. 60, 1505-1514.
- Prieto, C., García, C., Simarro, I., Castro, JM.** (2004). Temporal shedding and persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boars. *Vet. Rec.* 154, 824-827.
- Prieto, C., Castro, JM.** (2005). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar: a review. *Theriogenology* 63, 1-16.
- Prieto, C., Álvarez, E., Martínez-Lobo, FJ., Simarro, I., Castro, JM.** (2008). Similarity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains to vaccine strain is not necessarily predictive of the degree of protective immunity conferred. *Vet. J.* 175, 356-363.
- Prieto, C., Vázquez, A., Núñez, JI., Alvarez, E., Simarro, I., Castro, JM.** (2009). Influence of time on the genetic heterogeneity of Spanish porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Vet. J.* 180, 363-370.
- Prieto, C., Martínez-Lobo, FJ., Díez-Fuertes, F., Aguilar-Calvo, P., Simarro, I., Castro, JM.** (2010). Immunisation of pigs with a major envelope protein sub-unit vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) results in enhanced clinical disease following experimental challenge. *Vet. J.* 189, 323-329.
- Ramírez, E., Moreno, V., Díaz, N., Osorio, F., Ruiz, A., Neira, V., Quezada, M.** (2008). Evaluation of the pathogenicity and transmissibility of a Chilean isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Transbound Emerg. Dis.* 55, 115-124.
- Ramos, JA., Ramis, AJ., Marco, A., Domingo, M., Rabanal, R., Ferrer, L.** (1992). Histochemical and immunohistochemical study of the mucosal lymphoid system in swine. *Am. J. Vet. Res.* 53, 1418-1426.
- Reed, JJ., Muench, TH.** (1938). A simple method to estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* 27, 493-497.
- Reiner, G., Fresen, C., Bronnert, S., Willems, H.** (2009). Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) infection in wild boars. *Veterinary Microbiology*, 136, 250-258.

- Reynaud, G., Brun, A., Charreyre, C.** (2000). Zootechnical efficacy of vaccination of gilts and sows with an inactivated PRRS vaccine in a contaminated environmet. In: *Proceedings: The 16th International Pig Veterinary Society Congres*, Melbourne, Australia.
- Robertson, IB., Thrusfield, MV.** (1992). Porcine reproductive and respiratory syndrome (blue eared pig disease): some aspects of its epidemiology. *Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine: Tenth anniversary Proceedings 1st 3rd April* .
- Roic, B., Jemersic, L., Terzic, S., Keros, T., Balatinec, J., Florijancic, T.** (2012). Prevalence of antibodies to selected viral pathogens in wild boars (*Sus scrofa*) in Croatia in 2005-06 and 2009-10. *Journal of Wildlife Diseases*, 48, 131-7.
- Roof, MB., Gorcyca, D., Wensvoort, D.** (1999). Efficacy of a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine (Ingelvac PRRS) against heterologous virulent PRRS virus challenge (Lelystad strain).En: *Proc. 3rd International Symposium on PRRS and Aujeszky's Disease*, Ploufragan, France, p. 285.
- Roof, MB., Vaughn, EM., Burkhart, KM., Faaberg, KS.** (2003). Efficacy of modified live virus porcine reproductive and respiratory virus vaccines against heterologous respiratory challenge. En: *Proc. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases*, Roma, Italia, pp. 117-118.
- Ropp, SL., Wees, CE., Fang, Y., Nelson, EA., Rossow, KD., Bien, M., Arndt, B., Preszler, S., Steen, P., Christopher-Hennings, J., Collins, JE., Benfield, DA., Faaberg, KS.** (2004). Characterization of emerging European-like porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the United States. *J. Virol.* 78, 3684-3703.
- Rossow, KD., Bautista, EM., Goyal, SM., Murtaugh, MP., Molitor, TW., Morrison, RB., Benfield, DA., Collins, JE.** (1992). The effect of pig age on clinical disease and immunopathogenesis of SIRS virus infection. *Am. Assoc. Swine Pract. Neswl.* 4, 26.
- Rossow, KD., Bautista, EM., Goyal, SM., Molitor, TW., Murtaugh, MP., Morrison, RB., Benfield, DA., Collins, JE.** (1994). Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 3-12.
- Rossow, KD., Collins, JE., Goyal, SM., Nelson, EA., Christopher-Hennings, J., Benfield, DA.** (1995). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet. Pathol.* 32, 361-373.
- Rossow, KD., Benfield, DA., Goyal, S., Nelson, EA., Christopher-Hennings, J., Collins, JE.** (1996). Chronological immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs. *Vet. Pathol.* 33, 551-556.
- Rossow, KD., Shivers, JL., Yeske, PE., Polson, DD., Rowland, RR., Lawsor, Murtaugh, MP., Nelson, EA., Collins, JE.** (1999). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of neonatal pigs characterised by marked neurovirulence. *Vet. Rec.* 144, 444-148.

- Rowland, RR., Steffen, M., Ackerman, T., Benfield, DA.** (1999). The evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: quasispecies and emergence of a virus subpopulation during infection of pigs with VR-2332. *Virology* 259, 262-266.
- Royae, AR., Husmann, RJ., Dawson, HD., Calzada-Nova, G., Schnitzlein, WM., Zuckermann, FA., Lunney, JK.** (2004). Deciphering the involvement of innate immune factors in the development of the host response to PRRSV vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 199-216.
- Samsom, JN., de Bruin, TGM., Voermans, JJM., Meulenber, JJM., Pol, JMA., Bianchi, ATJ.** (2000). Changes of leukocyte phenotype and function in the broncho-alveolar lavage fluid of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a role for CD8+ cells. *J. Gen. Virol.* 81, 497-505.
- Sang, Y., Ross, CR., Rowland, RR., Blecha, F.** (2008). Toll-like receptor 3 activation decreases porcine arterivirus infection. *Viral Immunol.* 21, 303-313.
- Saper, CB., Breder, CD.** (1994). The neurologic basis of fever. *N. Engl. J. Med.* 330, 1880-1886.
- Schagemann, G., Kump, AW.** (1999). Safety and efficacy of Ingelvac PRRS MLV (RespPRRS/Repro) in sows at all stages of reproduction. En: *Proc. 3rd International Symposium on PRRS and Aujeszky's Disease*, Ploufragan, Francia, pp. 287-288.
- Schurrer, JA., Dee, SA., Moon, RD., Murtaugh, MP., Finnegan, CP., Deen, J., Kleiboeker, SB., Pijoan, CB.** (2005). Retention of ingested porcine reproductive and respiratory syndrome virus in houseflies. *American Journal of Veterinary Research*, 66, 1517- 1525.
- Schurrer, JA., Dee, SA., Moon, RD., Rossow, KD., Mahlum, C., Mondaca, E., Otake, S., Fano, E., Collins, JE., Pijoan, C.** (2006). Spatial dispersal of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-contaminated flies after contact with experimentally infected pigs. *American Journal of Veterinary Research*, 65, 1284-1292.
- Scortti, M., Prieto, C., Martínez-Lobo, FJ., Simarro, I., Castro, JM.** (2006a). Effects of two commercial European Modified-Live Vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome viruses in pregnant gilts. *Vet. J.* 136, 257-260.
- Scortti, M., Prieto, C., Simarro, I., Castro, JM.** (2006b). Reproductive performance of gilts following vaccination and subsequent heterologous challenge with European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology*. 66, 1884-1893.
- Scortti, M., Prieto, C., Álvarez, E., Simarro, I., Castro, JM.** (2007). Failure of an inactivated vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome to protect gilts against a heterologous challenge with PRRSV. *Vet. Rec.* 161, 809-813.
- Scruggs, DW., Sorden, SD.** (2001). Proliferative vasculopathy and cutaneous hemorrhages in porcine neonates infected with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Pathol.* 38, 339-342.

- Shen, G., Jin, N., Ma, M., Jin, K., Zheng, M., Zhuang, T., Lu, H., Zhu, G., Jin, H., Jin, M., Huo, X., Qin, X., Yin, R., Li, C., Li, H., Li, Y., Han, Z., Chen, Y., Jin, M.** (2007). Immune responses of pigs inoculated with a recombinant fowlpox virus coexpressing GP5/GP3 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine IL-18. *Vaccine* 25, 4193-4202.
- Shi, M., Lam, TT., Hon, CC., Hui, RK., Faaberg, KS., Wennblom, T., Murtaugh, MP., Stadejek, T., Leung, FC.** (2010). Molecular epidemiology of PRRSV: a phylogenetic perspective. *Virus Res.* 154, 7-17.
- Shimizu, M., Yamada, S., Murakami, Y., Morozumi, T., Kobayashi, H., Mitani, K., Ito, N., Kubo, M., Kimura, K., Kobayashi, M.** (1994). Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus from Heko-Heko disease of pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 56, 389-391.
- Shimizu, M., Yamada, S., Kawashima, K., Ohashi, S., Shimizu, S., Ogawa, T.** (1996). Changes of lymphocyte subpopulations in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 50, 19-27.
- Shin, JH., Kang, YB., Kim, YJ., Yeom, SH., Kweon, CH., Lee, WY., Jean, YH., Hwang, EK., Rhee, JC., An, SH., Cho, IS., Oh, JS., Joo, HS., Choi, CS., Molitor, TW.** (1993). Sero-epidemiological studies on porcine reproductive and respiratory syndrome in Korea. I. Detection of indirect fluorescent antibodies. *RDA Journal of Agricultural Science, Veterinary* 35, 572-576.
- Shin, JH., Torrison, J., Choi, CS., González, SM., Grabo, BG., Molitor, TW.** (1995). Monitoring of PRRS virus infection in boars. En: *2nd Internl Symp PRRS*. Copenhagen, Dinamarca. p. 55.
- Shin, JH., Torrison, J., Kang, YB., Molitor, TW.** (1996). In situ localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar tissues. En: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p.57.
- Shin, JH., Torrison, J., Choi CS., Gonzalez, SM., Crabo, BG., Molitor, TW.** (1997). Monitoring of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in boars. *Vet. Microbiol.* 55, 337-346.
- Silva-Campa, E., Flores-Mendoza, L., Reséndiz, M., Pinelli-Saavedra, A., Mata-Haro, V., Mwangi, W., Hernández, J.** (2009). Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritic cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology* 387, 373-379.
- Sirinarumitr, T., Zhang, Y., Kluge, JP., Halbur, G., Paul, PS.** (1998). A pneumo-virulent United States isolate of porcine reproductive and respiratory síndrome virus induces apoptosis in bystander cells both in vitro and in vivo. *J. Gen. Virol.* 79, 2989-2995.
- Snijder, EJ., Meulenber, JJ.** (1998). The molecular biology of arteriviruses. *J. Gen. Virol.* 69, 971-979.
- Spagnuolo-Weaver, M., Walker, IW., McNeilly, F., Calvert, V., Graham, D., Burns, K., Adair, BM., Allan, GM.** (1998). The reverse transcription polymerase chain reaction for the diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome: comparison with virus isolation and serology. *Vet. Microbiol.* 62, 207-215.

- Srinivasappa, J., Clark, J., Acree, B., Chu, HJ.** (1999). Safety of Fort Dodge Laboratories Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine in pigs. In: *Am. Assoc. of Swine Pract.* pp. 141-145.
- Stadejek, T., Kolodziejczyk, P., Pejsak, Z.** (1999). Safety and efficacy of Porcilis vaccine under experimental and field conditions. En: *Proc. 3rd International Symposium on PRRS and Aujeszky's disease*, Ploufragan, Francia, pp.293-294.
- Stadejek, T., Stankevicius, A., Storgaard, T., Oleksiewicz, MB., Belák, S., Drew, TW., Pejsak, Z.** (2002). Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for European and American viruses. *J. Gen. Virol.* 83, 1861- 1873.
- Stadejek, T., Oleksiewicz, MB., Potapchuk, D., Podgórska, K.** (2006). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *J. Gen. Virol.* 87, 1835-1841.
- Stevenson, GW., Van Alstine, WG., Kanitz, CL., Keffaber, KK.** (1993). Endemic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of nursery pigs in two swine herds without current reproductive failure. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 432-434.
- Steverink, PJGM., Pol, JMA., Bos-De Ruijter, JNA., Meulenberg, JJM.** (1999). Virulence of vABV414, the virus derived from the infectious cDNA clone of Lelystad virus, for third trimester pregnant gilts. En: *Proc. PRRS Aujeszky's Dis.* 119.
- Stockhofe-Zurwieden, N., Navarro Camarro, JA., Grosse-Beilage, E., Chavez, J., Pohlenz, J.** (1993). Uterine and placental alterations in pregnant sows associated with the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS). *J. Vet. Med. B.* 40, 261-271.
- Suárez, P., Díaz-Guerra, M., Prieto, C., Esteban, M., Castro, JM., Nieto, A., Ortín, J.** (1996a). Open Reading Frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. *J. Virol.* 70, 2876-82.
- Suárez, P., Zardoya, R., Martín, MJ., Prieto, C., Dopazo, J., Solana, A., Castro, JM.** (1996b). Phylogenetic relationships of European strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) inferred from DNA sequences of putative ORF-5 and ORF-7 genes. *Virus Res.* 42, 159-165.
- Sur, J., Doster, AR., Christian, JS., Galeota, JA., Wills, RW., Zimmerman, JJ., Osorio, FA.** (1997). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus replicates in testicular germ cells, alters spermatogenesis and induces germ cell death by apoptosis. *J. Virol.* 71, 9170-9179.
- Sur, J., Doster, A., Osorio, FA.** (1998). Apoptosis induced in vivo during acute infection by porcine reproductive and respiratory síndrome virus. *Vet. Pathol.* 35, 506-514.
- Sur, JH., Doster, AR., Galeota, JA., Osorio, FA.** (2001). Evidence for the localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen and RNA in ovarian follicles in gilts. *Vet. Pathol.* 38, 58-66.

- Suradhat, S., Thanawongnuwech, R.** (2003). Upregulation of interleukin-10 gene expression in the leukocytes of pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 84, 2755-2760.
- Suradhat, S., Thanawongnuwech, R., Poovorawan, Y.** (2003). Upregulation of IL-10 gene expression in porcine peripheral blood mononuclear cells by porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 84, 453-459.
- Swenson, SL., Hill, HT., Zimmerman, JJ., Evans, LE., Landgraf, JG., Wills, RW., Sandersen, TP., McGinley, MJ., Brevik, AK., Ciszewski, DK., Frey, ML.** (1994). Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204, 1943-1948.
- Swenson, SL., Hill, HT., Zimmerman, JJ., Evans, LE., Bechtol, D., Hopkins, S., Wills, R., Yoon, KJ., Schwartz, KJ., Hill, H., McGinley, MJ.** (1995). Exposure of gilts to PRRS virus by artificial insemination. En: *2nd Internl Symp on PRRS*, Copenhagen, Dinamarca.p.42.
- Takikawa, N., Kobayashi, S., Ide, S., Yamane, Y., Tanaka, Y., Yamagishi, H.** (1996). Detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in swine sera by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Vet. Med. Sci.* 58, 355-357.
- Teuffert, J., Schlüter, H., Müller, Th., Ohlinger, VF.** (1995). Boar semen a possible source of infection with PRRSV in breeding herds. En: *2nd Internl Symp PRRS*. Copenhagen, Denmark. p. 57.
- Thakur, KK., Revie, CW., Hurnik, D., Poljak, Z., Sanchez, J.** (2015). Simulation of between-farm transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Ontario, Canada using the North American Animal Disease Spread Model. *Preventive Veterinary Medicine*, 118, 413-426.
- Thanawongnuwech, R., Young, TF., Thacker, BJ., Thacker, EL.** (2001). Differential production of proinflammatory cytokines: in vitro PRRSV and Mycoplasma hyopneumoniae co-infection model. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79, 115-127.
- Tian, K., Yu, X., Zhao, T., Feng, Y., Cao, Z., Wang, C., Hu, Y., Chen, X., Hu, D., Tian, X., Liu, D., Zhang, S., Deng, X., Ding, Y., Yang, L., Zhang, Y., Xiao, H., Qiao, M., Wang, B., Hou, L., Wang, X., Yang, X., Kang, L., Sun, M., Jin, P., Wang, S., Kitamura, Y., Yan, J., Gao, GF.** (2007). Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. *PLoS One.* 2, 526.
- Torremorell, M., Henry, S., Christianson, WT.** (2003). Eradication using herd closure. In: *Zimmerman, J., Yoon, K.J., Neumann, E. (Eds.), PRRS compendium. National Pork Board, Pork Checkoff*, pp. 157-160.
- Torremorell, M., Rojas, M., Cuevas, L., De La Carrera, F., Lorenzo, F., Osorio, SF., Henry, S.** (2008). *National PRRSV eradication program in Chile. Int Pig Vet Soc Cong.*

- Trincado, C., Dee, SA., Rossow, KD., Halvorson, D., Pijoan, C.** (2004a). Evaluation of the role of mallard ducks as vectors of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *The Veterinary Record*, 154, 233-237.
- Truong, HM., Lu, Z., Kutish, GF., Galeota, J., Osorio, FA., Pattnaik, AK.** (2004). A highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus generated from an infectious cDNA clone retains the in vivo virulence and transmissibility properties of the parental virus. *Virology* 325, 308-319.
- Van Aken, D., Snijder, EJ., Gorbalenya, AE.** (2006). Mutagenesis analysis of the nsp4 main proteinase reveals determinants of arterivirus replicase polyprotein autoprocessing. *J. Virol.* 80, 3428-3437.
- Van Breedam, W., Van Gorp, H., Zhang, JQ., Crocker, PR., Delputte, PL., Nauwynck, HJ.** (2010). The M/GP(5) glycoprotein complex of porcine reproductive and respiratory syndrome virus binds the sialoadhesin receptor in a sialic acid-dependent manner. *PLoS Pathog.* 6.
- Van Breedam, W., Costers, S., Vanhee, M., Gagnon, CA., Rodríguez-Gómez, IM., Geldhof, M., Verbeeck, M., Van Doorselaere, J., Karniychuk, U., Nauwynck, HJ.** (2011). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-specific mAbs: supporting diagnostics and providing new insights into the antigenic properties of the virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 15; 141, 246-257.
- Van Der Linden, IFA., Van Der Linde-Bril, EM., Voermans, JJM., Van Rijn, PA., Pol, JMA., Martin, R., Steverink, PJGM.** (2003b). Oral transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by muscle of experimentally infected pigs. *Veterinary Microbiology*, 97, 45-54.
- Van Gorp, H., Van Breedam, W., Delputte, PL., Nauwynck, HJ.** (2008). Sialoadhesin and CD163 join forces during entry of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 89, 2943-2953.
- Van Gucht, S., Van Reeth, K., Pensaert, M.** (2003). Interaction between porcine reproductive-respiratory syndrome virus and bacterial endotoxin in the lungs of pigs: potentiation of cytokine production and respiratory disease. *J. Clin. Microbiol.* 41, 960-966.
- Van Hemert, MJ., de Wilde, AH., Gorbalenya, AE., Snijder, EJ.** (2008). The in vitro RNA synthesizing activity of the isolated arterivirus replication/transcription complex is dependent on a host factor. *J. Biol. Chem.* 283, 16525-16536.
- Van Reeth, K., Labarque, G., Nauwynck, H., Pensaert, M.** (1999). Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity. *Res. Vet. Sci.* 67, 47-52.
- Van Reeth, K., Nauwynck, H.** (2000). Proinflammatory cytokines and viral respiratory disease in pigs. *Vet. Res.* 31, 187-213.

Van Woensel, PAM., Liefkens, K., Demaret, S. (1998). Effect on viraemia of an American and European serotype PRRSV vaccine after challenge with European wild-type strains of the virus. *Vet. Record* 142, 510-512.

Van Woelsen P., Labarque, G., Nauwynck, H., Paul, G., Bonde Larsen, A., Eggen, A., Visser, N. (2000). Differentiation of european and north-american serotypes of PRRSV: prevalence and vaccine efficacy. In: *Proceedings: The 16th International Pig Veterinary Society Congress*, Melbourne, Australia.

Vanderheijden, N., Delputte, PL., Favoreel, HW., Vandekerckhove, J., Van Damme, J., Van Woensel, PA., Nauwynck, HJJ. (2003). Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages. *J. Virol.* 77, 8207-8215.

Vanhee, M., Delputte, PL., Delrue, I., Geldhof, MF., Nauwynck, HJ. (2009). Development of an experimental inactivated PRRSV vaccine that induces virus-neutralizing antibodies. *Vet. Res.* 40, 63.

Vanhee, M., Costers, S., Van Breedam, W., Geldhof, MF., Van Doorselaere, J., Nauwynck, HJ. (2010). A variable region in GP4 of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces neutralizing antibodies against homologous but not heterologous virus strains. *Viral Immunology* 23, 403-413.

Vanhee, M., Van Breedam, W., Costers, S., Geldhof, M., Noppe, Y., Nauwynck, H. (2011). Characterization of antigenic regions in the porcine reproductive and respiratory syndrome virus by the use of peptide-specific serum antibodies. *Vaccine* 29, 4794-4804.

Vashisht, K., Goldberg, TL., Husmann, RJ., Schnitzlein, W., Zuckermann, FA. (2008). Identification of immunodominant T-cell epitopes present in glycoprotein 5 of the North American genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 26, 4747-4753.

Velasova, M., Alarcon, P., Williamson, S., Wieland, B. (2012). Risk factors for porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection and resulting challenges for effective disease surveillance. *BMC Veterinary Research*, 8, 184.

Venteo, A., Rebollo, B., Sarraseca, J., Rodriguez, MJ., Sanz, A. (2012). A novel double recognition enzyme-linked immunosorbent assay based on the nucleocapsid protein for early detection of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J. Virol. Methods* 181, 109-113.

Verheije, MH., Welting, TJM., Jansen, HT., Rottier, PJM., Meulenberg, JJM. (2002). Chimeric arteriviruses generated by swapping of the M protein ectodomain rule out a role of this domain in viral targeting. *Virology* 303, 364-373.

Verheije, MH., Kroese, MV., Van Der Linden, IFA., de Boer-Luijtz, EA., Van Rijn, PA., Pol, JMA., Meulenberg, JJM., Steverink, PJGM. (2003). Safety and protective efficacy of porcine

reproductive and respiratory syndrome recombinant virus vaccines in young pigs. *Vaccine* 21, 2556-2563.

Vézina, SA., Loemba, H., Fournier, M., Dea, S., Archambault, D. (1996). Antibody production and blastogenic response in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.* 60, 94-99.

Vilcek, S., Molnar, L., Vlasakova, M., Jackova, A. (2015). The first detection of PRRSV in wild boars in Slovakia. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 128, 31-33.

Voicu, IL., Silim, A., Morin, M., Elazhory, MASY. (1994). Interaction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with swine monocytes. *Vet. Rec.*, 134: 422-423.

Wagstrom, EA., Yoon, KC., Cook, C., Zimmerman, JJ. (2000). Diagnostic performance of a reverse transcription-polymerase chain reaction test for porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 75-78.

Wagstrom, EA., Chang, CC., Yoon, KJ., Zimmerman, JJ. (2001). Shedding of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in mammary gland secretions of sows. *Am. J. Vet. Res.* 62, 1876-1880.

Wang, X., Eaton, M., Mayer, M., Li, H., He, D., Nelson, E., Christopher-Hennings, J. (2007a). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus productively infects monocyte-derived dendritic cells and compromises their antigen-presenting ability. *Arch. Virol.* 152, 289-303.

Wang, X., Li, J., Jiang, P., Li, Y., Zeshan, B., Cao, J., Wang, X. (2009). GM-CSF fused with GP3 and GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus increased the immune responses and protective efficacy against virulent PRRSV challenge. *Virus Res.* 143, 24-32.

Wang, Y., Liang, Y., Han, J., Burkhart, KM., Vaughn, EM., Roof, MB., Faaberg, KS. (2008). Attenuation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain MN184 using chimeric construction with vaccine sequence. *Virology.* 371, 418-429.

Weiland, E., Wiecek-Krohmer, M., Kohl, D. (1999). Monoclonal antibodies to the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are more effective in virus neutralization than monoclonal antibodies to the GP4. *Vet. Microbiol.* 66, 171-186.

Welch, SW., Jolie, R., Pearce, DS., Koertje, WD., Fuog, E., Shields, SL., Yoo, D., Calvert, JG. (2004). Construction and evaluation of genetically engineered replication-defective porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine candidates. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 277-290.

Wensvoort, G., Terpstra, D., Pol, JMA., ter Laak, EA., Bloemraad, M., de Kluyver, EP., Kragten, D., Van Buiten, L., den Besten, A., Wagenaar, F., Broekhuijsen, JM., Moonen, PLJM., Zetstra, T., de Boer, EA., Tibben, HJ., de Jong, MF., van't Veld, P., Groenland, GJR., Van Gennep, JA., Voets, MTH., Verheijden, JHM., Braamskamp, J. (1991). Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet. Q.* 13, 121-130.

Wensvoort, GDK., Luijze, EA., Den Besten, A., Harris, L., Collins, JE., Christianson, WT., Chladek, D. (1992). Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 134-138.

Wensvoort, G. (1993). Lelystad virus and the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome. *Vet. Res.* 24, 117-124.

Wesley, RD., Mengeling, WL., Lager, KL., Clouser, DF., Landgraf, JG., Frey, ML. (1998). Differentiation of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine strain from North American field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF5. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10, 140-144.

Wieczorek-Krohmer, M., Weiland, F., Conzelmann, K., Kohl, D., Visser, N., Van Woensel, P., Thiel, HJ., Weiland, F. (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): monoclonal antibodies detect common epitopes on two viral proteins of European and U.S. isolates. *Vet. Microbiol.* 51, 257-266.

Wills, RW., Zimmerman, JJ., Yoon, KJ., Swenson, SL., McGinley, MJ., Hill, HT., Platt, KB., Christopher-Hennings, J., Nelson, EA. (1997a). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. *Vet. Microbiol.* 55, 231-240.

Wills, RW., Zimmerman, JJ., Yoon, KJ., Swenson, SL., Hoffman, LJ., McGinley, MJ., Hill, HT., Platt, KB. (1997b). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of shedding. *Vet. Microbiol.* 30, 69-81.

Wills, RW., Doster, AR., Galeota, JA., Sur, J., Osorio, FA. (2003). Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Clin. Microbiol.* 41, 58-62.

Wissink, EH., Van Wijk, HA., Pol, JM., Godeke, GJ., Van Rijn, PA., Rottier, PJ., Meulenber, JJ. (2003). Identification of porcine alveolar macrophage glycoproteins involved in infection of porcine respiratory and reproductive syndrome virus. *Arch. Virol.* 148, 177-187.

Wissink, EHJ., Kroese, MV., Van Wijk, HAR., Rijsewijk, FAM., Meulenber, JJM., Rottier, PJM. (2005). Envelope protein requirements for the assembly of infectious virions of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol.* 79, 13495-12506.

Wu, W., Fang, Y., Farwell, R., Steffen-Bien, M., Rowland, RR., Christopher-Hennings, J., Nelson, EA. (2001). A 10-kDa structural protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus encoded by ORF2b. *Virology* 287, 183-191.

Wu, W., Fang, Y., Rowland, RR., Lawson, SR., Christopher-Hennings, J., Yoon, K., Nelson, EA. (2005). The 2b protein as a minor structural component of PRRSV. *Virus Res.* 114, 177-181.

Xiao, Z., Murtaugh, MP., Johnson, CR., Batista, L., Dee, S. (2003). Immunity to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): systemic and local responses in acute and persistent infection. En: *Proc. 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases*, Roma, Italia, pp. 45-46.

- Xiao, Z., Batista, L., Dee, S., Halbur, P., Murtaugh, MP.** (2004). The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load. *J. Virol.* 78, 5923-5933.
- Xue, Q., Zhao, YG., Zhou, YJ., Qiu, HJ., Wang, YF., Wu, DL., Tian, ZJ., Tong, GZ.** (2004). Immune responses of swine following DNA immunization with plasmids encoding porcine reproductive and respiratory syndrome virus ORFs 5 and 7, and porcine IL-2 and IFNgamma. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 291-298.
- Yaeger, MJ., Prieve, T., Collins, J., Christopher-Hennings, J., Nelson, E., Benfield, D.** (1993). Evidence for the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in boar semen. *Swine Health Prod.* 1, 7-9.
- Yang, L., Yoon, KJ., Lee, JH., Zimmerman, JJ., Frey, ML., Harmon, KM., Platt, KB.** (1999). Antigenic and genetic variations of the 15 kDa nucleocapsid protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates. *Arch. Virol.* 144, 525-546.
- Yang, L., Frey, ML., Yoon, KJ., Zimmerman, JJ., Platt, KB.** (2000). Categorization of North American porcine reproductive and respiratory syndrome viruses: epitopic profiles of N, M, GP5 and GP3 proteins and susceptibility to neutralization. *Arch. Virol.* 145, 1599-1619.
- Yeske, P.** (2010). Cost of eradicating diseases according to method. *Am Assoc Sw Vet. Pre Conference Seminar* 8, 15-18.
- Yoon, IJ., Joo, HS., Christianson, WT., Kim, HS., Collins, JE., Morrison, RB., Dial, GD.** (1992). An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swineinfertility and respiratory syndrome virus in swine sera. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 144-147.
- Yoon, IJ., Joo, HS., Christianson, WT., Morrison, RB., Dial, GD.** (1993). Persistent and contact infection in nursery pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Swine Health Prod.* 1, 5-8.
- Yoon, IJ., Job, HS., Goyal, SM., Molitor, TW.** (1994). A modified serum neutralization test or the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *J. Vet. Diagn. Invest.* 6, 289-292.
- Yoon, KJ., Zimmerman, JJ., Swenson, SL., McGinley, MJ., Eernisse, KA., Brevik, A., Rhinehart, LL., Frey, ML., Hill, HT., Platt, KB.** (1995). Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 305-312.
- Yoon, KJ., Wu, LL., Zimmerman, JJ., Hill, HT., Platt, KB.** (1996). Antibody-dependent enhancement (ADE) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection in pigs. *Viral Immunol.* 9, 51-63.
- Yoon, K., Wu, L., Zimmerman, JJ., Platt, KB.** (1997). Field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vary in their susceptibility to antibody dependent enhancement (ADE) of infection. *Vet. Microbiol.* 55, 277-287.

- Yoshihiro, M., Zhao, HK., Shigeki, I., Yasuyuki, M.** (2003). Mature interleukin-18 (IL-18) in silkworms using a hybrid Baculovirus expression system. *J.Vet.Med.Sci.* 65, 219-223.
- Zhang, Y., Sharma, RD., Paul, PS.** (1998). Monoclonal antibodies against conformationally dependent epitopes on porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet. Microbiol.* 63, 125-136.
- Zhang, J., Zhou, C., Guo, X., Ge, X., Yang, H.** (2009). The structural proteins of the Chinese highly pathogenic porcine reproductive and respiratory virus do not contribute to its virulence. En: *2009 International PRRS Symposium*. Chicago. Illinois. EE.UU.
- Zheng, Q., Chen, D., Li, P., Bi, Z., Cao, R., Zhou, B., Chen, P.** (2007a). Co-expressing GP5 and M proteins under different promoters in recombinant modified vaccinia virus ankara (rMVA)-based vaccine vector enhanced the humoral and cellular immune responses of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Virus Genes* 35, 585-595.
- Zheng, QS., Bi, ZX., Li, P., Chen, DS., Chen, PY.** (2007b). Construction and the immunogenicity of the recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara co-expressing ORF4, ORF5 and ORF6 genes of porcine reproductive and Respiratory Syndrome Virus NJ-a strain. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* 47, 345-349.
- Zhou, Y., Barghusen, S., Choi, C., Rossow, K., Collins, J., Laber, J., Molitor, T., Murtaugh, M.** (1992). Effect of SIRS virus infection on leukocyte populations in the peripheral blood and on cytokine expression in alveolar macrophages of growing pigs. *Am. Assoc. Swine Pract.News.* 4, 28.
- Ziebuhr, J., Snijder, EJ., Gorbalenya, AE.** (2000). Virus-encoded proteinases and proteolytic processing in the Nidovirales. *J. Gen. Virol.* 81, 853-879.
- Zimmerman, JJ., Sanderson, T., Earnise, K., Hill, H., Frey, M.** (1992). Transmission of SIRS virus in convalescent animals to commingled penmates under experimental conditions. *Am. Assoc. Swine Pract. News.* 4, 25.
- Zimmerman, JJ., Yoon, KJ., Pirtle, EC., Wills, RW., Sanderson, TJ., McGinley, MJ.** (1997). Studies of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection in avian species. *Veterinary Microbiology*, 55, 329-336.
- Zuckermann, FA., Garcia, EA., Luque, ID., Christopher-Hennings, J., Doster, A., Brito, M., Osorio, F.** (2007). Assessment of the efficacy of commercial porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccines based on measurement of serologic response, frequency of gamma-IFN-producing cells and virological parameters of protection upon challenge. *Vet. Microbiol.* 123, 69-85.

